

УДК 571.27

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ КУР И КРОЛИКОВ В КОНКУРЕНТНОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ МЕТОДЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРОВЬЕГО β -КАЗОМОРФИНА-7

© 2019 г. А. А. Печелюлько¹, Ю. Н. Тараканова¹, Д. А. Дмитриев¹, Ю. С. Массино¹, В. Ю. Кост², Е. А. Рогожин^{2,3}, О. Л. Сегал¹, А. Д. Дмитриев¹. *

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: add0547@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.08.2018 г.

После доработки 19.03.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Проведено сравнение эффективности кроличьих и куриных (IgY) поликлональных антител в конкурентном твердофазном методе иммуноферментного анализа (ИФА) для определения опиоидного пептида β -казоморфина 7 (КМ-7), образующегося из коровьего бета-казеина типа А1. Для получения антител животных (4 курицы и 4 кролика) иммунизировали (по одинаковой схеме) конъюгатом КМ-7 с бычьим сывороточным альбумином. Сравнение кривых связывания меченого биотином КМ-7 с аффинноочищенными куриными и кроличьими антителами, адсорбированными в оптимальных условиях на полистироловых планшетах, показало, что в рамках данной панели антитела кроликов связывали антиген в среднем в 100 раз более эффективно, чем антитела кур. Наиболее эффективные антитела одного из кроликов использовали для конструирования высокочувствительного твердофазного конкурентного метода ИФА для определения КМ-7 (минимальная детектируемая концентрация 0.2 нг/мл). Вследствие низкой аффинности антитела кур оказались не пригодны для этого метода. Полученные результаты указывают на необходимость при конструировании количественных методов ИФА с использованием антител кур проводить сравнения с методом, в котором используются антитела млекопитающих.

Ключевые слова: антитела кур, коровий β -казоморфин 7, IgY-технология

DOI: 10.1134/S0555109919060102

В последние годы в научной литературе неоднократно высказывались предположения о возможности широкого использования поликлональных антител (ПКА) кур класса IgY в качестве компонентов в иммунохимических аналитических (диагностических) тест-системах, вместо поликлональных, а в некоторых случаях и моноклональных антител (МКА), получаемых путем иммунизации млекопитающих [1–3]. При этом обычно указывалось на следующие потенциальные преимущества подобной замены. Неспособность IgY связываться с ревматоидным фактором и Fc-рецепторами, активировать систему комплемента млекопитающих, но способность снижать уровень неспецифических реакций в иммунодиагностических системах. Немалое значение имеют отно-

сительная дешевизна метода и биоэтические преимущества, связанные с возможностью выделения значительного количества IgY из желтков куриных яиц [1–3].

Предполагается также, что ПКА кур теоретически могут облегчить разработку иммунохимических тест-систем для определения антигенов, получение иммунного ответа к которым у млекопитающих затруднено или вообще невозможно. Считается, что большая филогенетическая дистанция между курами и млекопитающими может определять высокую иммунореактивность при иммунизации кур антигенами млекопитающих (вследствие их малой гомологии с белками кур) и возможность получать антитела более широкой эпитопной специфичности. В дополнение к этому антитела

кур обладают меньшей перекрестной реактивностью с белками млекопитающих [1–3].

Новые возможности открываются при получении рекомбинантных МКА кур [4, 5]. В техническом плане это является менее сложной задачей, чем получение рекомбинантных МКА млекопитающих, поскольку первичная структура молекулы IgY характеризуется определенными особенностями. Так, для амплификации последовательностей легких и тяжелых цепей антител кур с помощью ПЦР требуется значительно меньше число праймеров, чем в случае антител млекопитающих [4]. Также считается, что IgY-антитела легче подвергаются процессу “гуманизации” (замены последовательностей кур на последовательности человека), необходимой при использовании антител в иммунотерапии [4]. В результате появились биотехнологические компании, специализирующиеся на производстве моноклональных рекомбинантных IgY-антител для разработки новых эффективных иммунодиагностических систем и иммунотерапевтических препаратов.

Следует отметить, что впечатляющие успехи технологий получения рекомбинантных МКА не приводят к исчезновению потребности в получении (когда это возможно) “обычных” природных антител (сохраняющих нативную структуру IgY) для использования в иммунохимических тест-системах. Получение МКА кур с нативной структурой теоретически возможно с помощью классической гибридомной технологии (путем слияния лимфоцитов иммунных кур с линией клеток миеломы кур). Однако куриные гибридомы оказывались нестабильными (в отличие от мышиных и крысиных гибридом), что значительно осложнило широкое использование данного подхода [4]. Поэтому в настоящее время наиболее технически доступным и экономичным способом получения нативных молекул куриных антител для использования в иммунохимическом анализе и иммунодиагностике остается иммунизация кур с последующим выделением ПКА из желтков яиц. За прошедшие годы опубликованы сообщения о получении антител кур для определения разнообразных антигенов: онкомаркеров [6, 7], гормонов [8], белков вирусов [9–11], патогенных бактерий [12–14], простейших [15], гельминтов [16], прионов [17] и других биомолекул [2]. Это может создавать впечатление легкости замены антител млекопитающих на ПКА кур во многих тест-системах. Вместе с тем известно, что структуры молекул IgY и IgG существенно различаются вследствие того, что у первых отсутствует шарнирный участок, придающий им гибкость [1–3]. Филогенетическая дивергенция, обуславливающая различия в иммунной системе кур и млекопитающих, может быть не только преимуществом IgY-технологии, но и создавать препятствия для распознавания некоторых антигенов иммунной системой [5]. Поэтому

при использовании в иммунохимических тест-системах представляется важным более детальное изучение эффективности куриных ПКА по сравнению с антителами млекопитающих. Ранее нами была изучена возможность замены ПКА и МКА млекопитающих на антитела кур в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) [18]. Удалось получить эффективные ПКА кур к HBsAg и использовать их вместо иммобилизованных мышиных МКА в сэндвич-методе его определения, сохранив высокую аналитическую чувствительность ИФА (хотя и несколько сниженную по сравнению с исходным вариантом).

Представлялось также важным проанализировать антитела кур в сравнении с антителами млекопитающих при использовании в другом формате ИФА, а именно конкурентном методе.

Цель работы – сравнение эффективности антител кур и ПКА кроликов в конкурентном методе ИФА для определения β -казоморфина-7 (КМ-7) – опиоидного пептида (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile), образующегося из коровьего β -казеина типа A1 [19].

МЕТОДИКА

Использованные материалы. В работе использовали разборные 96-луночные планшеты из полистирола “MaxiSorp” (“Nunc”, Дания), стрептавидин-пероксидазу (“Biosource”, США), биотин – EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (“Thermo fisher Scientific”, США) BrCN-цефазозу (“Farmacia”, Швеция) и прочие реактивы (“Sigma”, США), также раствор тетраметилбензидаина (ТМБ) (НПО “Диагностические системы”, Россия).

Получение биотинилированного казоморфина. Получение биотинилированного казоморфина проводили 2 методами.

Метод 1. К 1.6 мл раствора КМ-7 (2 мг/мл) в 0.1 М NaHCO₃, pH 8.0, добавляли 8 мл LC-LC-биотина (2 мг/мл), растворенного в том же буфере. Реакцию проводили в течение 2 ч на ледяной бане. Биотинилированный пептид очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на гидрофобной колонке (“Agilent technologies”, США), согласно рекомендациям фирмы.

Метод 2. Биотинилированный казоморфин синтезировался методом твердофазного химического синтеза.

В работе использовали описанные ранее [18] методы: (1) иммунизации животных, (2) определения антител в иммунных сыворотках кроликов и желтках яиц кур, (3) приготовления аффинных носителей, (4) аффинной очистки антител из сывороток кроликов и желтков яиц кур, (5) определение антигенсвязывающей активности аффинноочищенных антител с адсорбированным антигеном и (6) антигенсвязывающей активности

адсорбированных антител с растворимым антигеном. Параметром, характеризующим связывание КМ-7-биотина с иммобилизованными антителами, считали коэффициент кривой связывания, определяемый как тангенс угла наклона линейного участка кривой связывания к оси концентраций [20–22].

ВЭЖХ-анализ. Очистку продуктов реакции биотинилирования осуществляли с использованием аналитической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Продукты реакции 5 мкм, растворенные в 1 мл 25 мМ Na-фосфатного буфера наносили на колонку XBridge C18 VEN 130 Å (4.6 × 250 мм, “Waters”, Ирландия), предварительно уравновешенную 5%-ным растворителем Б (80%-ным CH₃CN, содержащим 0.1% ТФУ). После элюции с колонки не связавшихся соединений, осуществляли разделение связавшихся компонентов линейным градиентом повышающейся концентрации растворителя Б от 5 до 50% в течение 60 мин при скорости потока подвижной фазы 0.9 мл/мин. Детектирование компонентов проводили при 214 нм.

Оптимизация условий адсорбции тестируемых антител. В данной работе оптимальными считали такие условия адсорбции аффинноочищенных антител, которые обеспечивали их максимальное связывание с антигеном в растворе.

Оптимизация pH адсорбции. Антитела (100 мкл на лунку) адсорбировали на поверхность планшетов в течение 16–20 ч при комнатной температуре, используя на первом этапе избыток антител (10 мкг/мл). Для адсорбции использовали следующие буферы: 0.1 М глицин-HCl-буфер, pH 2.8, 0.025 М Na-фосфатный буфер, pH 7.5, и 0.05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9.5. Антигенсвязывающую активность сорбированных антител определяли как описано выше.

Определение оптимального количества антител, сорбируемых на поверхность планшетов. Оптимальное количество антител, адсорбируемых на иммунные планшеты, определяли, как описано ранее при оптимальном pH адсорбции (см. предыдущий раздел). Оптимальное количество адсорбируемых антител составляло (с несущественными отклонениями от указанных значений) 6 для антител кроликов и 12 мкг/мл для антител кур [18].

Определение КМ-7 конкурентным ИФА. Определение КМ-7 конкурентным ИФА проводили по описанной ранее методике с некоторыми модификациями [19]. Антитела адсорбировали на поверхность лунок планшетов (6 мкг/мл антител кролика и 12 мкг/мл антител кур в оптимальном буфере) в течение 16–20 ч при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку вносили по 50 мкл растворов КМ-7-биотина (2 нг/мл для кроличьих и 300 нг/мл для куриных антител в ИФА-буфере), затем добавляли 50 мкл растворов

КМ-7 с нарастающим его количеством от 0 до 1000 мкг/мл. Смесь инкубировали в течение 2 ч при 37°. После промывки планшеты инкубировали со стрептавидин-пероксидазой и окрашивали ТМБ как описано ранее [18, 22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунный ответ при иммунизации животных конъюгатом КМ-7 с БСА. В работе провели сравнительный анализ эффективности аффинноочищенных кроличьих и куриных антител в конкурентном твердофазном ИФА. В качестве антигена был выбран КМ-7 – пептид, который является фрагментом β-казеина типа А1 молока коров и обладает свойствами опиоидных пептидов [19]. Ранее у нас был успешный опыт создания высокочувствительного иммуноферментного метода определения указанного лиганда с использованием ПКА кроликов [19], на который мы опирались в настоящей работе. В качестве иммуногена использовали конъюгат КМ-7 с БСА. Иммунный ответ определяли по связыванию антител сывроток кроликов или желтков яиц кур с иммобилизованным КМ-7. После 5–6 раундов иммунизации у всех животных (4 курицы и 4 кролика) были обнаружены антитела к КМ-7. Антитела были очищены аффинно на колонке с CNBr-сефарозой, конъюгированной с КМ-7. Коэффициенты кривых связывания аффинноочищенных кроличьих антител с иммобилизованным КМ-7 варьировали в пределах от 0.053. до 0.125, то есть различались в 2.4 раза (кривые связывания антител с иммобилизованным антигеном не приводятся). Наибольшую эффективность при связывании с иммобилизованным антигеном демонстрировали антитела кролика № 1 ($k = 0.1250$). Коэффициенты кривых связывания куриных антител были существенно меньше и укладывались в пределы 0.0012–0.004. Однако эти предварительные оценки не обеспечивали возможность сравнения антигенсвязывающей активности куриных и кроличьих антител, так как антикуриные и антикроличьи конъюгаты, которые использовались для выявления иммунных комплексов, могли существенно различаться по активности. Вместе с тем можно было сделать вывод, что как кроличьи, так и куриные антитела давали иммунный ответ при иммунизации КМ-7. При связывании с иммобилизованным антигеном наибольшую активность показали аффинные кроличьи антитела № 1 и аффинные антитела кур № 4.

Определение оптимальных условий адсорбции аффинноочищенных антител кроликов и кур на поверхности иммунных планшетов. Для сравнения конкурентных иммуноферментных методов определения КМ-7 с применением антител кур и млекопитающих предполагалось использовать панели с аффинноочищенными ПКА кур и кроликов, которые наибо-

Таблица 1. Значения рН адсорбции аффинноочищенных куриных и кроличьих антител, при которых наблюдалось максимальное связывание с биотинилированным β -казоморфином-7

Номер животного	Оптимальные рН адсорбции тестируемых антител	
	кролики	куры
1	7.5	7.5/9.5*
2	7.5	7.5/9.5*
3	7.5	7.5/9.5*
4	7.5/9.5 *	7.5/2.8*

* Коэффициенты кривых связывания при двух указанных значениях рН совпадали.

лее эффективно связывали меченый антиген после адсорбции на твердую фазу в оптимальных условиях. Под оптимальными понимались такие условия адсорбции антител (рН адсорбции и насыщающую концентрацию), которые обеспечивали их максимальную антигенсвязывающую активность. В качестве параметра, характеризующего эффективность связывания антител с антигеном, использовали аналитическую чувствительность метода, которая равнялась тангенсу угла наклона линейного участка кривой связывания к оси концентраций (угловой коэффициент кривой обозначен буквенным символом k) [20–22]. Это является одним из применяемых способов оценки и сравнения эффективности методов ИФА в процессе их оптимизации [20, 23].

Сохранение высокой антигенсвязывающей активности адсорбированных антител, наряду с аффинностью, является, тем фактором, который обеспечивает максимальную чувствительность анализа в конкурентном твердофазном ИФА [24].

Таким образом, первоначальный этап сравнения свойств ПКА кур и кроликов предполагал оптимизацию условий адсорбции на поверхность полистироловых планшетов для каждого из восьми полученных ПКА. В реальной практике обычно варьируют два фактора: насыщающую концентрацию антител и рН буфера, который используется для насыщения. Оптимальные насыщающие концентрации аффинноочищенных антител равнялись (с несущественными отклонениями) 6 мкг/мл для антител кроликов и 12 мкг/мл для антител желтков куриных яиц.

На следующем этапе был определен оптимальный рН адсорбции аффинноочищенных антител. Традиционно считают, что оптимальными буферными системами для адсорбции антител на поверхность планшетов являются фосфатный и карбонатный буферы рН 7.5 и 9.5. Вместе с тем ранее были описаны антитела млекопитающих и кур, максимальная антигенсвязывающая активность которых прояв-

лялась после адсорбции в более жестких условиях при рН 2.8 [18, 21, 22]. Было определено, при каких значениях рН адсорбции тестируемые антитела смогли проявить максимальную антигенсвязывающую активность. Для адсорбции использовались буферы со следующими значениями рН: 2.8, 7.5 и 9.5 (состав буферов см. в разделе “Методика”). После насыщения планшетов были построены кривые связывания биотинилированного КМ-7 с адсорбированными антителами. Сводные данные по оптимальным рН адсорбции приведены в табл. 1. Оказалось, что оптимальный рН адсорбции кроличьих антител № 1, 2 и 3 равнялся 7.5, а для одного из тестируемых антител (№ 4) было выявлено два оптимальных рН адсорбции – рН 7.5 и 9.5. Вместе с тем антитела трех кур (№ 1, 2 и 3) одинаково эффективно связывали биотинилированный казоморфин после адсорбции как при рН 7.5, так и при рН 9.5 (табл. 1). А одно из куриных антител (№ 4) характеризовалось максимумом связывания биотинилированного КМ-7 после иммобилизации при двух значениях рН: 7.5 и 2.8 (табл. 1).

Описанные эксперименты можно проиллюстрировать рис. 1, на котором представлены кривые связывания меченого биотином КМ-7 с аффинноочищенными куриными антителами (рис. 1б), адсорбированными при упомянутых значениях рН. Подобные кривые для кроличьих антител представлены на рис. 1а, который наглядно иллюстрировал, насколько существенно зависела от рН адсорбции антител их антигенсвязывающая активность. Так, после адсорбции при рН 7.5 коэффициент кривой связывания равнялся 0.76. При связывании КМ-7-биотина после адсорбции антител кролика при рН 2.8 коэффициент кривой уменьшался в 13 раз ($k = 0.06$).

Эффективность связывания биотинилированного КМ-7 с аффинноочищенными антителами кроликов и кур. Сводные данные о коэффициентах кривых связывания КМ-7-биотина с антителами приведены в табл. 2. Как следует из данных, представленных в таблице, связывание биотинилированного КМ-7 с антителами кур оказалось гораздо менее эффективным, чем с антителами кроликов. Так, лучшие куриные антитела № 2 ($k = 0.040 \pm 0.002$, табл. 2) связывали КМ-7-биотин в 190 раз менее эффективно, чем лучшие антитела кролика № 1 ($k = 7.62 \pm 0.13$). Связывание лучших куриных антител № 2 было также в 13 раз меньше связывания, регистрируемого при использовании худших антител кролика № 3.

В целом, адсорбированные куриные антитела связывали КМ-7-биотин в 100 раз менее эффективно, чем антитела кроликов (если исходить из средних значений коэффициентов кривых связывания). Среднее значение коэффициентов кривых связывания куриных антител с биотинилированным КМ-7 составляло ≈ 0.024 , а для кроличьих ан-

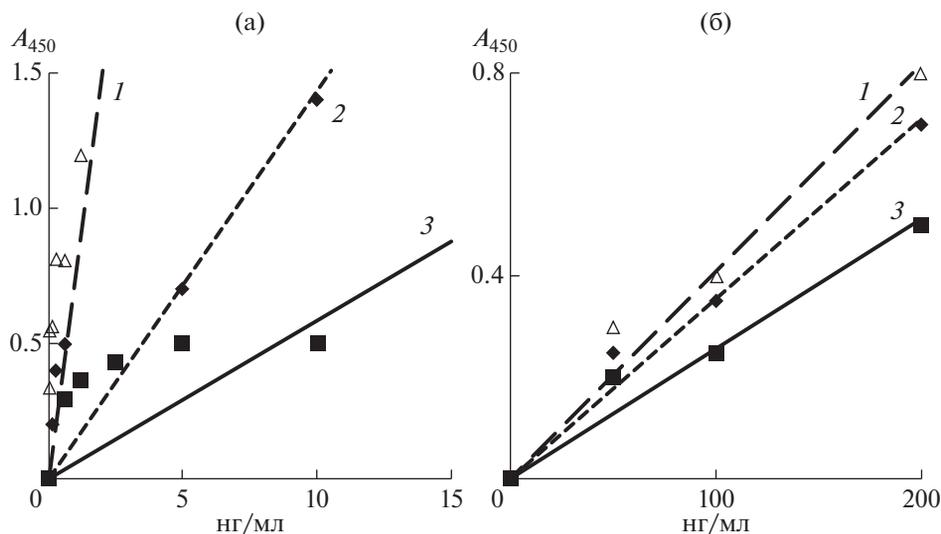


Рис. 1. Связывание биотинилированного β -казоморфина-7 (нг/мл) с аффинноочищенными антителами кроликов (а) и кур (б): а – адсорбция антител при рН 7.5 (1) – $y = 0.76x$, при рН 9.5 (2) – $y = 0.14x$, при рН 2.8 (3) – $y = 0.06x$; б – адсорбция антител при рН 7.5 (1) – $y = 0.0042x$, при рН 9.5 (2) – $y = 0.0037x$, при рН 2.8 (3) – $y = 0.0026x$.

тител соответствующее значение равнялось ≈ 2.50 . Следует принять во внимание, что в данных опытах на планшеты адсорбировалось в два раза больше антител кур (12 мкг/мл), чем антител кроликов (6 мкг/мл).

Сравнение эффективности куриных и кроличьих антител в конкурентном ИФА определения КМ-7. Для построения конкурентных калибровочных кривых определения β -казоморфина-7, были выбраны антитела, которые обнаруживали максимальную антигенсвязывающую активность после адсорбции при оптимальных условиях: куриные антитела № 2, оптимум адсорбции – рН 7.5 ($k = 0.04 \pm 0.002$) и кроличьи антитела № 1, оптимум адсорбции рН 7.5 ($k = 7.62 \pm 0.13$). Полученные результаты приведены на рис. 2. Как показано на рис. 2, при использовании ПКА кролика удалось получить качественную калибровочную кривую в диапазоне концентраций КМ-7 0.2–12 нг/мл между 90 и 10% ингибированием связывания био-

тинилированного β -казоморфина-7 с иммобилизованными антителами. Минимальная определяемая концентрация (снижение поглощения при тестируемой концентрации относительно поглощения, даваемого нулевым стандартом ± 3 среднеквадратичных отклонения) КМ-7 составила 0.2 ± 0.016 нг/мл, что примерно соответствовало результату, полученному в предыдущей работе [19]. Однако кривая, полученная с антителами кур, не могла считаться пригодной для определения концентрации исследуемого антигена в силу низкой способности иммобилизованных на твердой фазе ПКА кур связывать КМ-7 (хотя эти антитела также адсорбировали в оптимальных условиях).

Интерес к изучению опиоидного пептида КМ-7 возник в 80 гг. прошлого века, когда на основании ряда исследований (часть из которых осуществлена крупными компаниями – производителями молока в Новой Зеландии) возникло предположение, что этот пептид может повышать риск возникно-

Таблица 2. Коэффициенты кривых связывания биотинилированного казоморфина-7 с антителами, адсорбированными на поверхность планшетов, в оптимальных условиях

Номер животного	Коэффициенты кривых связывания адсорбированных антител с β -казоморфином-7 ($k \times 10 \pm$ доверительный интервал, $n = 6$)	
	антитела кроликов	антитела кур
1	7.62 ± 0.13	0.020 ± 0.001
2	0.61 ± 0.03	0.040 ± 0.002
3	0.53 ± 0.03	0.022 ± 0.001
4	1.25 ± 0.01	0.012 ± 0.001
Среднее	2.50	0.024

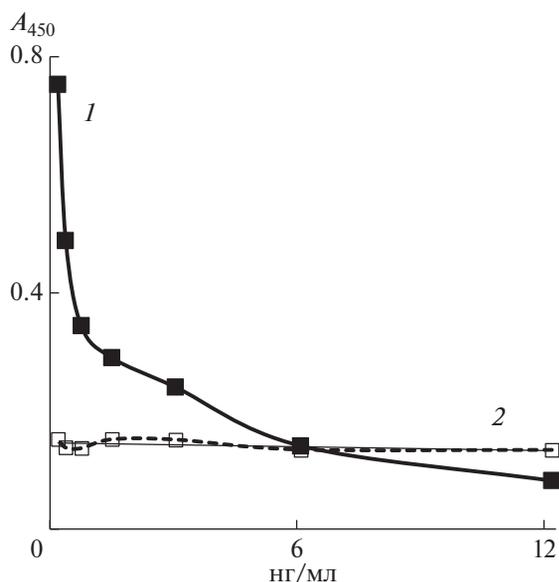


Рис. 2. Конкурентный метод определения β -казоморфина-7 с аффинноочищенными антителами кроликов и кур, адсорбированными на поверхность планшетов в оптимальных условиях. 1 – кроличьи ПКА, 2 – куриные ПКА. Уравнение логарифмической кривой $y = -0.145 \ln(x) + 0.3944$; $R^2 = 0.9072$.

вения диабета, сердечно-сосудистых болезней, детского аутизма и других заболеваний [25]. КМ-7 образуется в пищеварительном тракте при расщеплении β -казеина молока А1. При расщеплении β -казеина молока А2 этот пептид не образуется. Породы коров отличаются по содержанию β -казеинов А1 и А2. В Азии и Африке распространены коровы, образующие только β -казеин типа А2. Молоко, содержащее только казеин этого типа, получило название “молока А2”. Однако в других регионах, например, Европе, США, Новой Зеландии в молоке коров содержатся казеины обоих типов – А1 и А2 [25]. В связи с возникшими подозрениями о вреде пептида КМ-7 для здоровья человека ряд производителей молочной продукции стали активно рекламировать молоко А2 и получаемые из него продукты. Вместе с тем эти опасения в отношении КМ-7 не получили достаточных подтверждений в дальнейших исследованиях, однако появилось новое предположение: о возможном неблагоприятном влиянии КМ-7 на пищеварительную систему, приводящем к непереносимости молока. Недавно группа экспертов из Германии и Венгрии, работающих в рамках Кокрановского сотрудничества, провела новый анализ имеющихся в литературе данных по влиянию пептида КМ-7 на здоровье человека. Согласно опубликованному ими в 2019 г. обзору, имеется умеренная вероятность того, что КМ-7, образующийся при потреблении молока А1, может неблагоприятно влиять на пищеварение, однако связь этого пептида

с другими заболеваниями очень маловероятна. Тем не менее, как заключают авторы обзора, вопрос требует дальнейшего изучения [25]. В связи с этими обстоятельствами существует необходимость в конструировании эффективных методов ИФА для определения КМ-7, которые могут быть основаны как на антителах млекопитающих, так и антителах кур (если последнее возможно).

При анализе нами литературных данных была обнаружена всего лишь одна работа (опубликованная в 1998 г. исследователями из Канады), которая также была посвящена получению ПКА кур, специфичных к КМ-7 и описанию их свойств [26]. Содержание этого исследования более подробно раскрыто в диссертация [27] одного из соавторов (по результатам которой и написана указанная статья) [26]. В работе описан конкурентный метод определения КМ-7, основанный на использовании куриных антител. У авторов не было цели сравнить эффективность ПКА кур и ПКА млекопитающих, задачей было получение конкурентного метода для определения данного антигена. При этом канадские исследователи использовали несколько другой (по сравнению с нашей работой) формат конкурентного метода: на твердую фазу адсорбировали антиген (КМ-7), а не ПКА к КМ-7. Этот формат (обычно считается, что он дает несколько меньшую чувствительность) позволял авторам избавляться от примеси ПКА к БСА путем отмывок [27] (этой проблемы не было в использованном нами методе). Авторам удалось получить конкурентный метод определения КМ-7 на основе ПКА кур, с минимальной детектирующей дозой 5 нг/мл, хотя, как сообщается в этой работе, иммунный ответ был получен только у одной из 6 иммунизированных кур.

В нашей работе, хотя все куры дали иммунный ответ, но он был намного слабее чем у кроликов. И очищенные ПКА кур оказались недостаточно эффективными, для создания конкурентного иммуноферментного метода определения КМ. При этом мы легко воспроизвели на кроликах результаты нашей прошлой работы, в которой описан конкурентный метод определения КМ-7 [19] и получили еще один конкурентный метод (на основе ПКА кроликов), с кривыми связывания, позволяющими измерять антиген примерно в том же диапазоне концентраций. Такие ПКА могут представлять интерес для изучения физиологических эффектов КМ-7 в эксперименте (например, у лабораторных животных) и у человека (показана возможность не только образования КМ-7 в желудочно-кишечном тракте при потреблении молока, но и попадания данного пептида в кровеносную систему и другие органы и ткани, например, у детей) [19, 25]. Также некоторые авторы делали попытки использовать антитела к КМ-7 для обнаружения (в сочетании с методами очистки пеп-

тидов) примесей этого пептида в молочных продуктах [28].

Существует предположение, что филогенетическая удаленность кур от млекопитающих создает условие для получения сильного иммунного ответа к ряду антигенов из белкового репертуара млекопитающих, в связи с отсутствием у кур сходных структур и молекул. Однако, как показывает наша работа и отчасти работа канадских авторов (в который иммунный ответ был получен только у одной из 6 кур) это предположение не может считаться универсальным. Известно, что куры имеют менее эффективную систему презентации антигена, что может приводить к полному отсутствию иммунного ответа к ряду агентов, в зависимости от гаплотипа главного комплекса гистосовместимости (МНС) [5, 28]. В отношении такого антигена, как КМ-7, то имея в виду феномен иммунологической толерантности, в том числе к β -казеину [29], следует заметить, что по своей первичной структуре КМ-7 также является достаточно “чужим” антигеном для кроликов, так как, хотя гены β -казеина у млекопитающих имеют значительную гомологию, участок из которой выщепляется пептид КМ-7 отличается значительной дивергенцией. Например, если в молекуле β -казеина молока коров и человека в соответствующем участке находится характерная аминокислотная последовательность Тур-Pro-Phe [30], то у кролика сохраняется только две аминокислоты, Pro-Phe, из этой общей последовательности [31].

В то же время, в недавней работе нами были получены IgY-антитела кур к НВsAg, которые показали высокую эффективность в сэндвич-методе определения НВsAg, хотя и несколько меньшую (на 30%), чем эталонные МКА к этому вирусного белку [18].

Таким образом, по всей видимости, замена антител млекопитающих на IgY антитела вряд ли является таким универсально применимым подходом, как это представлялось в начале внедрения IgY-технологии. Однако она предоставляет собой еще одну полезную альтернативу при создании высокоэффективных антител для разнообразных иммунохимических тест-систем, особенно в сочетании с современными методами получения рекомбинантных антител, позволяющих искусственно увеличивать их аффинность [4, 5].

В работе проведено сравнение антигенсвязывающих свойств образцов антител, специфичных к КМ-7, полученных от 4 кур и 4 кроликов, иммунизированных этим пептидом. Иммунный ответ кур на антиген был намного слабее, чем у кроликов, и эффективность ПКА кур оказалась слишком низкой для создания конкурентного метода определения КМ-7. В то же время, используя ПКА кролика, удалось создать тест-систему (твердофазный конкурентный метод ИФА) для опреде-

ления КМ-7 с высокой аналитической чувствительностью, которая может быть полезна для анализа КМ-7. С учетом литературных данных по получению ПКА кур к различным антигенам и опыта авторов [18] по получению высокоэффективных ПКА кур к НВsAg, результаты, полученные в работе, не подвергают сомнению полезности использования ПКА кур для конструирования твердофазных методов ИФА. Однако они указывают на необходимость в случае каждого конкретного антигена проводить сравнение эффективности тест-систем с использованием ПКА кур с методами, основанными на применении антител млекопитающих (кроликов, МКА мышей и др.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H.R. // *Altern. Lab. Anim.* 2005. V. 33. № 2. P. 129–154.
2. Dias da Silva W., Tambourgi D.V. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010. V. 135. № 3–4. P. 173–180.
3. Spillner E., Braren I., Greunke K., Seismann H., Blank S., du Plessis D. // *Biologicals.* 2012. V. 40. № 5. P. 313–322.
4. Lee W., Syed Atif A., Tan S.C., Leow C.H. // *J. Immunol. Methods.* 2017. V. 447. P. 71–85.
5. Júnior F.Á., Pacheco dos S.J., de Oliveira S.I., Alves M.A., Leonel E.G., Rodrigues R.I. // *Ciência Rural.* 2018. V. 48. № 8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180250>
6. Łupicka-Słowik A., Walczak M., Grzywa R., Bobrek K., Łęcka M., Boivin S., Gawel A., Stefaniak T., Oleksyszyn J., Sięńczyk M. // *Bioanalysis.* 2014. V. 6. № 23. P. 3197–3213.
7. Xiao Y., Gao X., Gannot G., Emmert-Buck M.R., Srivastava S., Wagner P.D., Amos M.D., Barker P.E. // *Int. J. Cancer.* 2008. V. 122. № 10. P. 2178–2186.
8. Kuronen I., Kokko H., Mononen I., Parviainen M. // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997. V. 35. № 6. P. 435–440.
9. Di Lonardo A., Marcante M.L., Poggiali F., Hamsaikova E., Venuti A. // *Arch. Virol.* 2001. V. 146. № 1. P. 117–125.
10. de Paula V.S., da Silva Ados S., de Vasconcelos G.A., Iff E.T., Silva M.E., Kappel L.A., Cruz P.B., Pinto M.A. // *J. Virol. Methods.* 2011. V. 171. № 1. P. 102–106.
11. Nafea N.M., Sabbah M.A., Al-Suhail R., Mahdavi A.H., Asgary S. // *Adv. Biomed. Res.* 2015. V. 4. P. 100. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.156678>
12. Almeida C.M.C., Quintana-Flores V.M., Medina-Acosta E., Schriefer A., Barral-Netto M., Dias da Silva W. // *Scand. J. Immunol.* 2003. V. 57. № 6. P. 573–582.
13. Chalghoumi R., Théwis A., Portetelle D., Beckers Y. // *Poult. Sci.* 2008. V. 87. № 1. P. 32–40.
14. Meenatchisundaram S., Shanmugam V., Anjali V.M. // *J. Basic. Clin. Pharm.* 2011. V. 2. № 2. P. 109–114.
15. Ferreira Júnior Á., Santiago F.M., Silva M.V., Ferreira F.B., Macêdo Júnior A.G., Mota C.M., Faria M.S., Silva Filho H.H., Silva D.A., Cunha-Júnior J.P., Mineo J.R., Mineo T.W. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. P. e40391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>

16. *Lei J.H., Su B.T., Xu H., Shen J.L., Guan X.H., Feng Z.Q., Li Y.L., Xu M.X., Liu W.Q.* // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011. V. 85. № 6. P. 1054–1059.
17. *Matsuda H., Mitsuda H., Nakamura N., Furusawa S., Mohri S., Kitamoto T.* // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999. V. 23. № 3. P. 189–194.
18. *Печелюлько А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Лавров В.Ф., Дмитриев А.Д.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 1. С. 104–114.
19. *Kost N.V., Sokolov O.Y., Kurasova O.B., Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Gabaeva M.V., Zolotarev Y.A., Dayan A.K., Grachev S.A., Korneeva E.V., Mikheeva I.G., Zozulya A.A.* // *Peptides.* 2009. V. 30. № 10. P. 1854–60.
20. *Pardue H.L.* // *Clin. Chem.* 1997. V. 43. № 10. P. 1831–1837.
21. *Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Yakovleva D.A., Dmitriev D.A., Phartooshnaya O.V., Kolyaskina G.I., Massino Y.S., Borisova O.V., Segal O.L., Smirnova M.B., Ulanova T.I., Lavrov V.F.* // *J. Immunoassay Immunochem.* 2013. V. 34. № 4. P. 414–437.
22. *Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л., Скоблов Ю.С., Уланова Т.И., Лавров В.Ф., Дмитриев Д.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2015. Т. 51. № 4. С. 424–433.
23. *Li D., Cui Y., Morisseau C., Gee S.J., Bever C.S., Liu X., Wu J., Hammock B.D., Ying Y.* // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 11. P. 6248–6256.
24. *Butler J.E.* // *Methods in Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* / Eds. Decker J. and Reischl J. Totowa, N. J.: Humana Press Inc. 2004. P. 333–372.
25. *Küllenberg de Gaudry D., Lohner S., Schmucker C., Kapp P., Motschall E., Hörlein S., Röger C., Meerpohl J.J.* // *Nutr. Rev.* 2019. V. 77. № 5. P. 278–306.
26. *Yannakis J., Ozimek L.* // *Milchwissenschaft.* 1998. V. 53. № 8. S. 436–440.
27. *Yannakis J.* Development of IgY antibodies in egg-yolk against beta-casomorphin-7. A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research for the degree of Master of Science. Canada. University of Alberta. 1997. 98 p.
28. *Kaufman J.* // *Trends in Immunology.* 2018. V. 39. № 5. P. 367–379.
29. *Derbinski J., Pinto S., Rosch S., Hexel K., Kyewski B.* // *PNAS.* 2008. V. 105. № 2. P. 657–662.
30. *Enjapoori A.K., Kukuljan S., Dwyer K.M., Sharp J.A.* // *Nutrition.* 2019. V. 57. P. 259–267
31. *Lönnnerdal B., Bergström S., Andersson Y., Hjalmarsson K., Sundqvist A.K., Hernell O.* // *FEBS Lett.* 1990. V. 269. № 1. P. 153–156.

A Comparative Analysis of the Efficiency of Chicken and Rabbit Antibodies in Competitive Enzyme Linked Immunoassay for the Detection of Bovine Beta-Casomorphin 7

A. A. Pechelyulko^a, Y. N. Tarakanova^a, D. A. Dmitriev^a, Y. S. Massino^a, V. Y. Kost^b, E. A. Rogozhin^{b, c}, O. L. Segal^a, and A. D. Dmitriev^{a, *}

^a*Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, 105064 Russia*

^b*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Moscow, 117997 Russia*

^c*Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia*

^{*}*e-mail: add0547@yandex.ru*

Received August 08, 2018; revised March 19, 2019; accepted June 20, 2019

Rabbit and chicken (IgY) polyclonal antibodies were compared with respect to their performance in competitive enzyme linked immunoassays (ELISA) for the determination of opioid peptide β -Casomorphin 7 (BCM-7), released from variant A1 of bovine beta-casein. To obtain antibodies, the animals (4 rabbits and 4 hens) were immunized (using similar regimes) with BCM-7, conjugated to bovine serum albumin. The comparison of binding curves obtained with affinity purified mammalian and avian antibodies immobilized at the surface of polystyrene microtiter immunoplates by passive adsorption (in optimal conditions), showed that rabbit antibodies captured biotinylated antigen 100 times more efficiently than hen antibodies within the given antibody panel. The most efficient rabbit antibodies were used to construct the highly sensitive competitive ELISA for the detection of BCM-7 (the minimal detection limit 0.2 ng/ml). The chicken antibodies proved unsuitable for such application because of low affinity. These results indicate that in constructing quantitative ELISA based on chicken polyclonal antibodies it is needed to make comparisons with the methods based on mammalian antibodies.

Keywords: chicken antibodies, bovine β -casomorphin 7, IgY technology