Изучение влияния метки коллоидного золота на способность антител взаимодействовать с вирусом на примере Х-вируса картофеля (ХВК) и вируса табачной мозаики (ВТМ)

Матузенко Светлана

Работа проводилась в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, в лаборатории иммунобиохимии.

Научный руководитель: Сафенкова Ирина Викторовна

Москва, 2009 г.

Целью исследования было изучение влияния метки коллоидного золота на способность антител взаимодействовать с вирусом на примере Х-вируса картофеля (ХВК) и вируса табачной мозаики (ВТМ).

Задачи:

- Изучить взаимодействие вирусов с нативными препаратами антител.
- Изучить взаимодействие вирусов и конъюгатов антител с коллоидным золотом.
- Охарактеризовать изменения взаимодействия антител с вирусами при их иммобилизации на поверхности коллоидного золота.

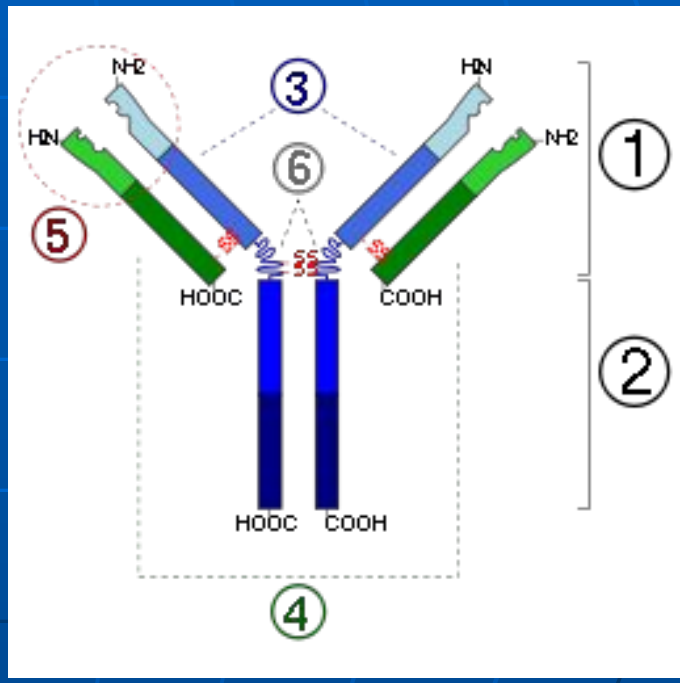
Гипотеза

Иммобилизация антител на коллоидном золоте происходит преимущественно по участкам их поверхностей, не входящим в антиген-связывающие сайты.

Поэтому антитела при иммобилизации

не теряют

функциональности.



Общий план строения антител: 1) Fab; 2) Fc; 3) тяжелая цепь; 4) легкая цепь; 5) антиген-связывающий участок; 6) шарнирный участок

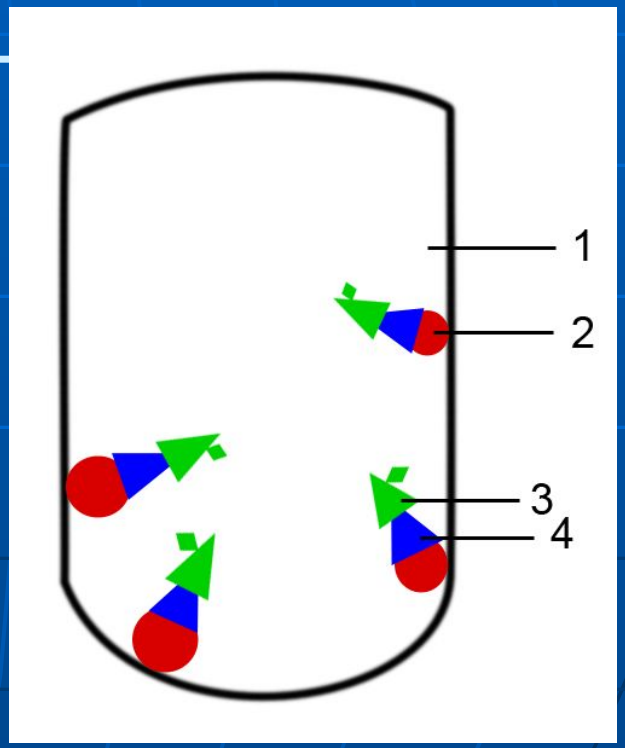
В работе использовались

- Х-вирус картофеля (ХВК)
- Вирус табачной мозаики (ВТМ)
- Моноклональные антитела против ХВК и ВТМ
- Коллоидное золото
- Конъюгат коллоидного золота с антителами
- Конъюгат антивидовых антител с пероксидазой хрена.
- Метод иммуноферментного анализа (ИФА)
- Метод электронной микроскопии
- Метод атомно-силовой микроскопии
- Метод иммуно-хроматографического анализа.

Проверка взаимодействия немодифицированных антител с вирусами с помощью

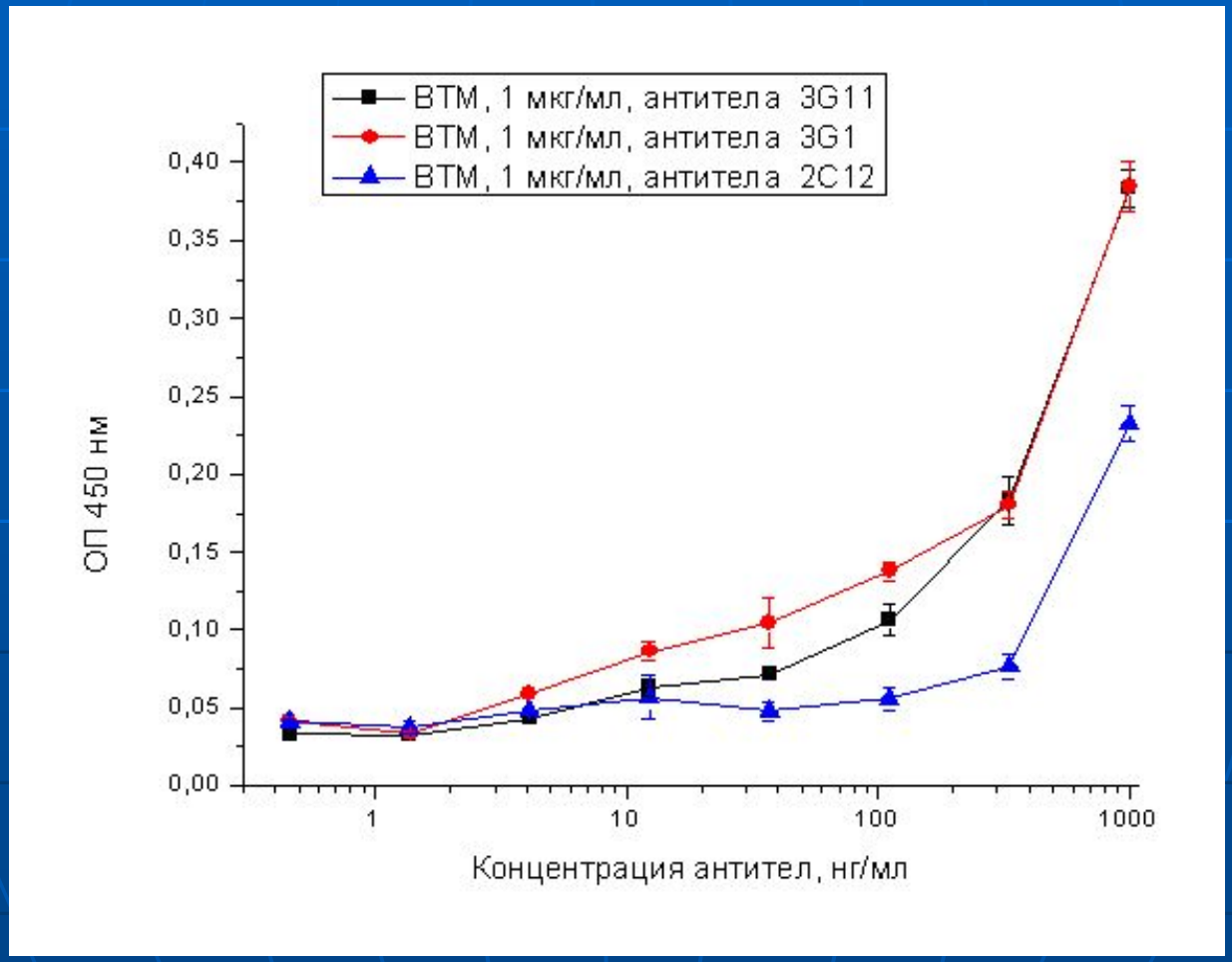
о ан

Фотография микропланшета



Схематическое изображение образования иммунных комплексов при проведении ИФА: 1 – лунка, 2 – вирус, 3 – конъюгат антитела с пероксидазой хрена, 4 – антитело

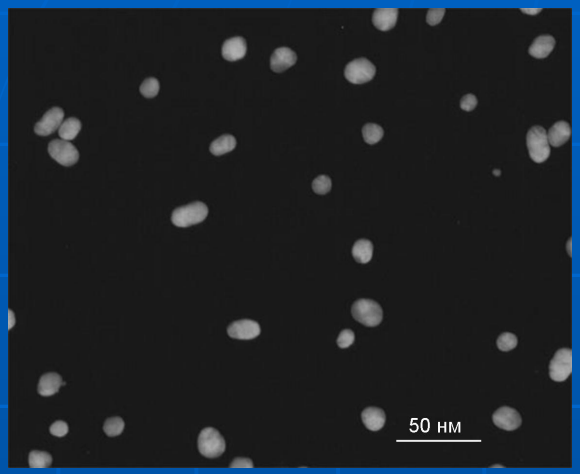
Концентрационная зависимость взаимодействия антител с иммобилизованным ВТМ в системе ИФА



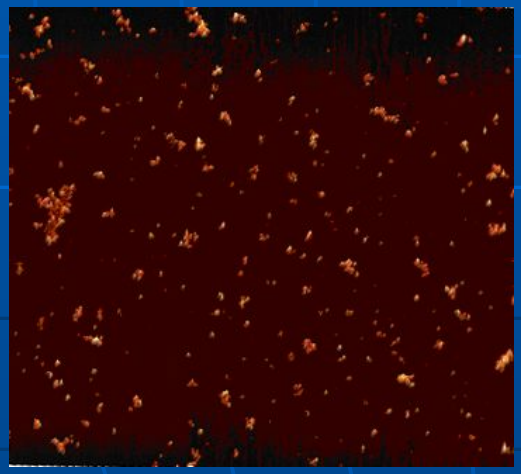
Выводы по ИФА взаимодействия моноклональных антител с ВТМ

- Количество иммунных комплексов, регистрируемых методом ИФА, зависит от концентрации и антител и вируса, что позволяет проводить выбор антител, наиболее эффективно взаимодействующих с вирусом.
- Из трех охарактеризованных антител против ВТМ для дальнейшей работы было выбрано 3G11, связывание которого регистрируется в концентрации до 20 нг/мл.

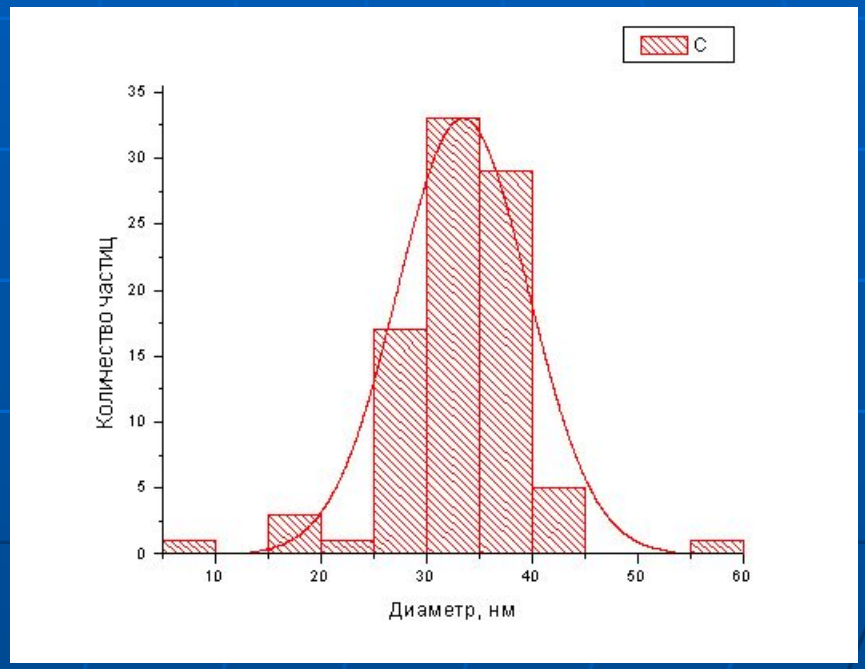
Получение и характеристика коллоидного золота



Электронно-микроскопическая фотография препарата коллоидного золота



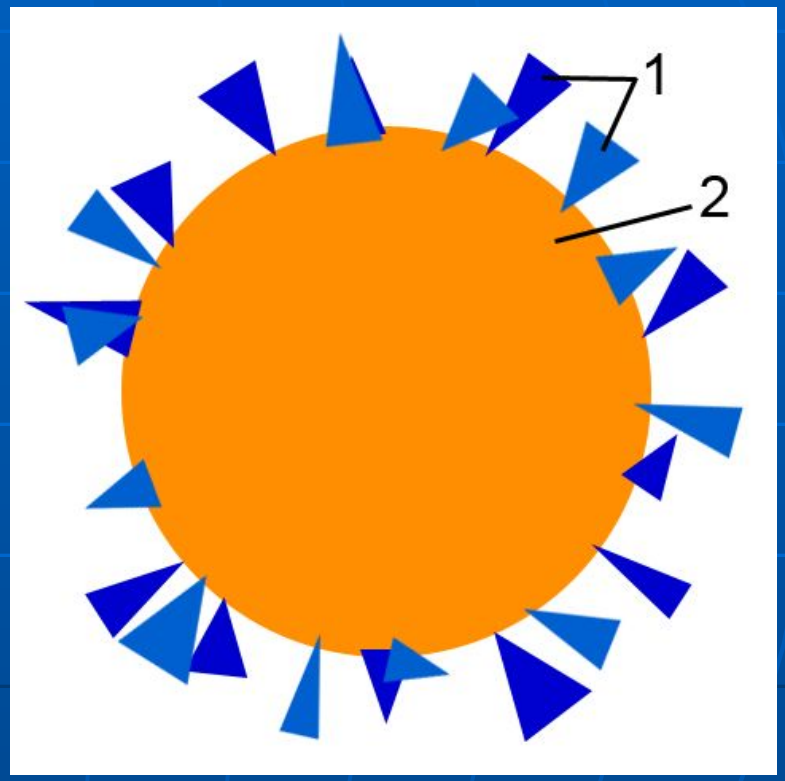
3D-изображение препарата коллоидного золота (атомно-силовая микроскопия)



Гистограмма распределения частиц по диаметру

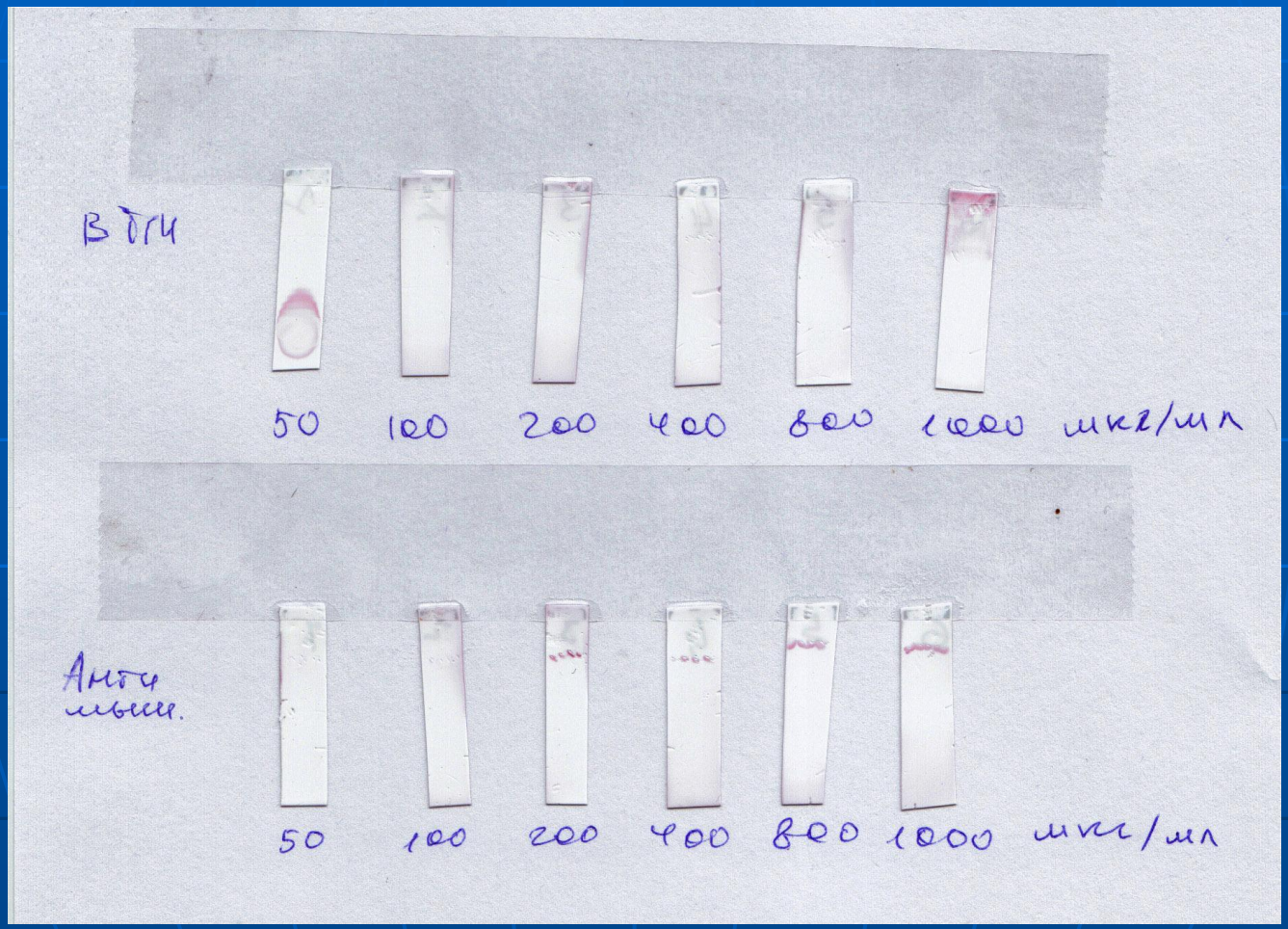
Получение конъюгатов коллоидного золота с антителами.

- Диализ антител
- Определение концентрации антител по оптической плотности при длине волны 280 нм
- Определение оптимальной концентрации антител для получения стабильных неагрегирующих конъюгатов с КЗ
- Синтез конъюгатов
- Спектрофотометрическая характеристика конъюгата

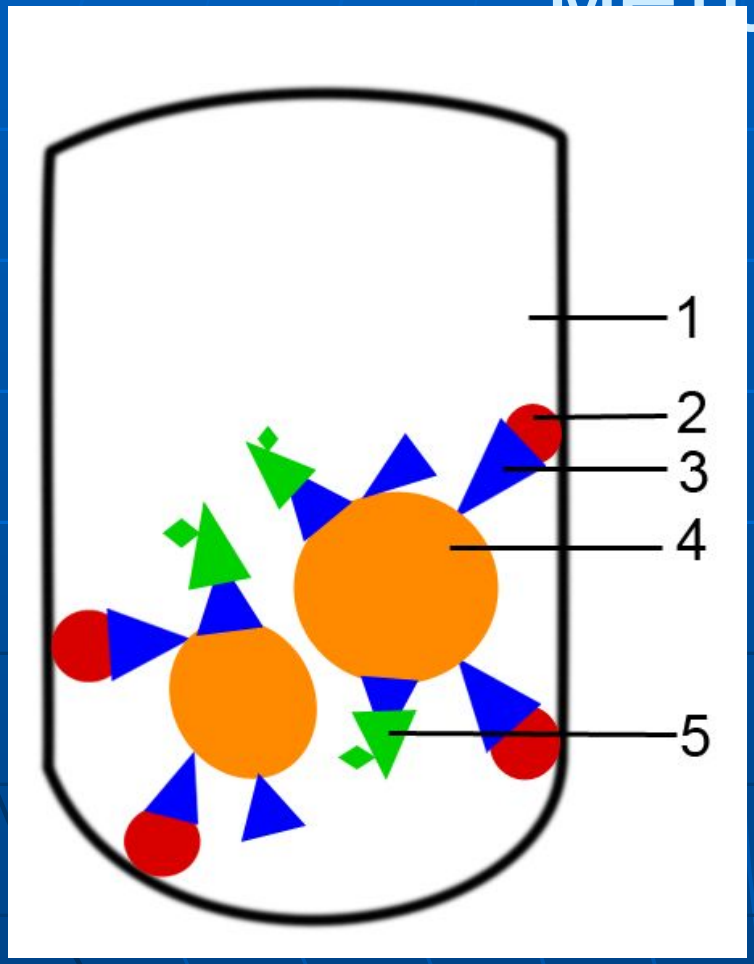


Схематическое изображение конъюгата коллоидного золота (2) с антителами (1)

Проверка работы конъюгата с помощью иммунохроматографического анализа

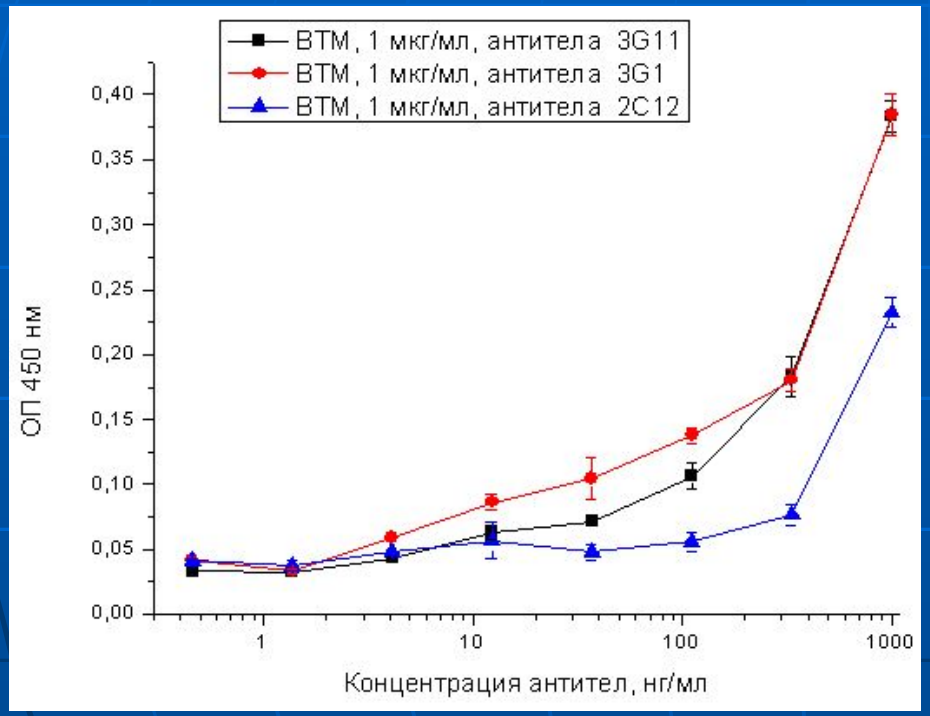


Проверка взаимодействия вирусов и конъюгатов антител методом ИФА

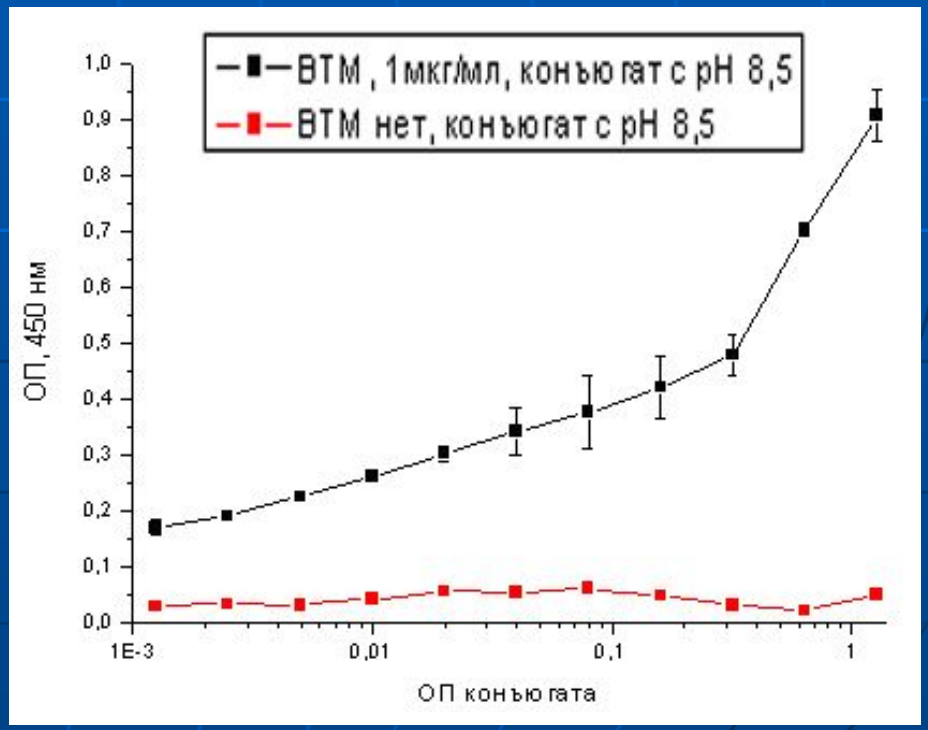


- Схематическое изображение образования иммунных комплексов: 1 – лунка, 2 – вирус, 3 – антитела, 4 – частица коллоидного золота, 5 – конъюгат антивидовых антител с пероксидазой хрена.

Сравнение взаимодействия с ВТМ немодифицированных антител и конъюгатов коллоидного золота с антителами



ИФА взаимодействия ВТМ и немодифицированных антител



ИФА взаимодействия ВТМ и конъюгатов коллоидного золота с антителами

Вывод

Антитела, специфичные к вирусам (ХВК и ВТМ), не теряют функциональности при иммобилизации на частицах коллоидного золота. При этом уровень связывания в системе ИФА выше для конъюгированных с коллоидным золотом антител, чем для немодифицированных антител в той же концентрации. Таким образом, наша гипотеза полностью подтвердилась.

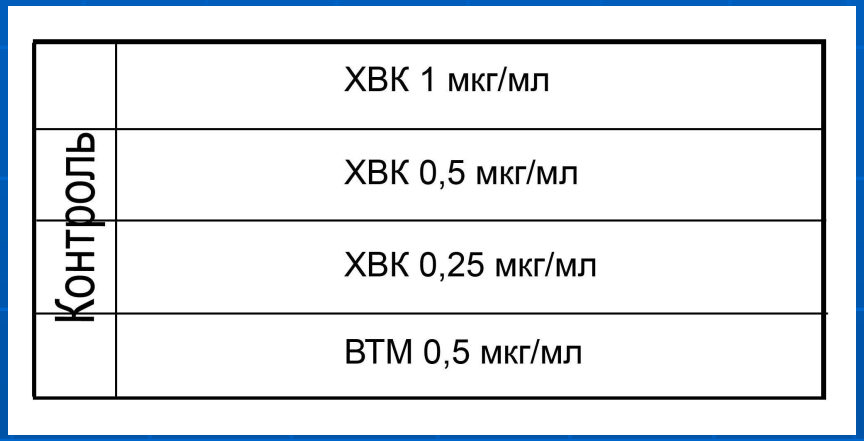
Используемая литература

- Вершигора А.Е. Общая иммунология. // К.: Выща шк. 1989. С. 101.
- Галактионов В.Г. Иммунология. // М.: Нива России. 2000. С. 48-74.
- Feinstein A., Rove A.J. Molecular mechanism of formation of an antigen-antibody complex. // Nature. 1965. V. 4967. P. 147-149.
- Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. // М.: Высш. шк. 1991. С. 20-25.
- Антитела. Ред. Кэтти Д., М.: Мир. 1991. Т. 1. С. 11-30, 39, 105-111.
- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ.- М.: Мир, 2002. С. 210-222
- Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. С. 124-127.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Романенко О.Г., Титова Н.А., Трубачева Ж.Н., Чередникова Т.В., Еремин С.А. Твердофазные методы иммуноферментного определения гербицидов симазина и атразина. Прикладная биохимия и микробиология. 1995 т. 31, N 1, сс. 134-139.

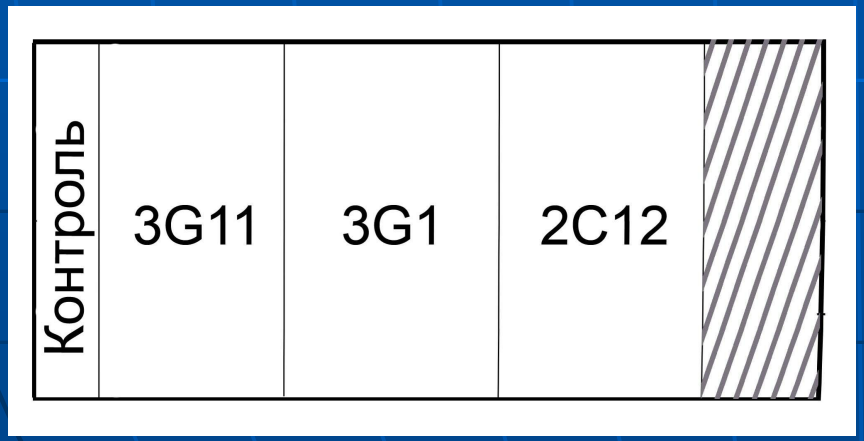
Благодарности

Я благодарю сотрудников лаборатории иммунобиохимии Института биохимии им. А.Н. Баха, в частности моего научного руководителя, Ирину Викторовну Сафенкову, за помощь в работе, а так же Сергея Менделевича Глаголева за организацию биопрактики.

Имуннoферментный анализ



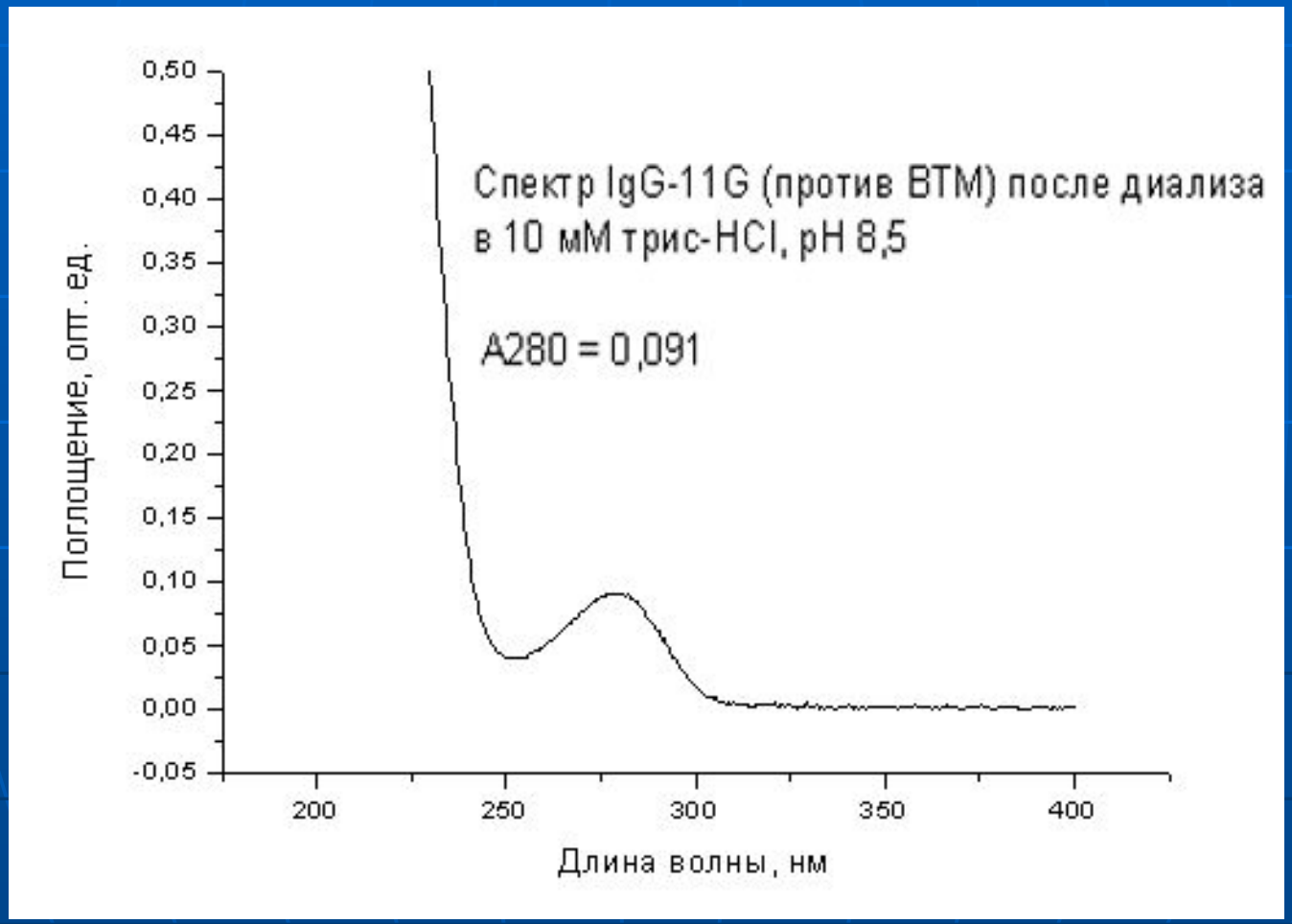
- Первый столбец лунок оставлен под контроль, а в остальные добавлено по 100 мкл раствора вируса в **ФБ (**фосфатный буфер) (для каждой – по две строки).



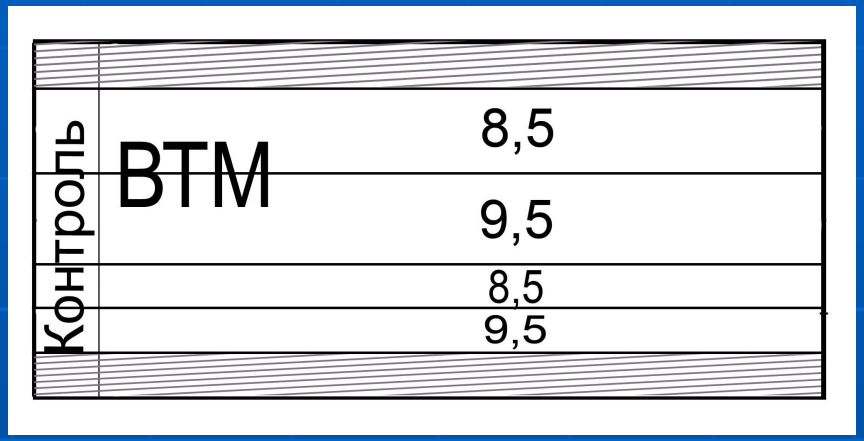
- Первый столбец был оставлен под контроль, в следующие раститрованы антитела (по три столбца на каждое антитело) 3G11, 3G1, 2C12. В последние два столбца ничего не добавляли.

(pH 8,5) IgG-11G (mg/ml) = [(A(280)*10]/1,4=

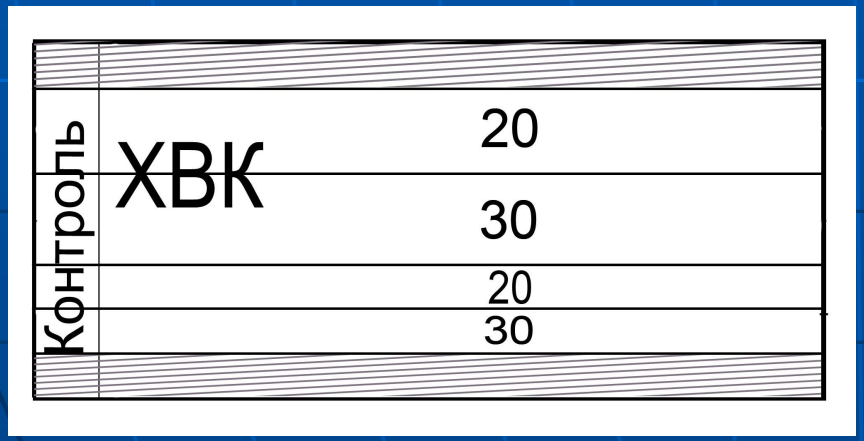
[0,091*10]/1,4 = 0,65 mg/ml



Имуннoферментный анализ



- (8,5 и 9,5 – значения pH конъюгатов)



- (20 и 30 – размер частиц коллоидного золота)