

УДК 571.27

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЛОКИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ БУФЕРОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ТИТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-COV-2
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ***А.Д. Бидина, В.Ю. Кан, П.М. Петрова, Д.Е. Зрелкин, Д.В. Воронина**НИЦЭМ имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,
Россия*

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, является чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения. Эффективные диагностические инструменты пользуются большим спросом, поскольку быстрое и крупномасштабное тестирование играет ключевую роль в оценке эпидемиологической ситуации, индивидуальном мониторинге пациентов, а также проверке иммуногенности новых вакцин.

Иммуногенность вакцин оценивается на животных, в частности на мышах, с последующим определением титра антител в иммуноферментном анализе (ИФА). Поэтому для получения достоверных результатов требуется оптимизация условий проведения ИФА с сывороткой опытных животных. Ключевую роль в снижении неспецифического и фонового сигнала играет выбор блокирующего буфера. Блокирующий буфер представляет собой раствор смеси белков, которые адсорбируются на поверхности лунки планшета, тем самым устраняя гидрофобное связывание иммуноглобулинов с иммуносорбентом, а также неспецифические белок-белковые взаимодействия.

Целью данного исследования являлось определение оптимального состава блокирующего буфера для количественной оценки титра антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови иммунизированных мышей.

В качестве блокирующих агентов использовали бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин, обезжиренное сухое молоко в различных концентрациях (1–5 %). Твердофазный сэндвич-ИФА проводили, иммобилизуя рецептор-связывающий домен S-белка вируса SARS-CoV-2 на поверхности полистиролового 96-луночного планшета. Для промывания планшетов, а также для разведения блокирующих агентов использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,05 % Твин-20. Опытная сыворотка была получена путем внутримышечной иммунизации мышей линии Balb/c аденовирусным вектором, кодирующим последовательность S-белка SARS-CoV-2. Отрицательным контролем являлась сыворотка интактных животных. Блокирующую способность буферов оценивали по уровню снижения неспецифического сигнала.

В результате, при использовании обезжиренного молока, независимо от концентрации, несмотря на низкие фоновые значения, уровень специфического сигнала был в два раза ниже, чем при использовании казеина или BSA. Титр антител в иммунной сыворотке определялся как 1:1600. BSA в качестве блокирующего агента показал превышение фонового сигнала во всех концентрациях (1–5 %) в 5 раз по сравнению с двумя другими буферами. Это может объясняться большим молекулярным весом фрагментов BSA, что оставляет некоторые участки пластиковой поверхности планшета незаблокированными, с которыми могут связываться компоненты системы на следующих стадиях анализа. Титр антител составил 1:800. Оптимальные значения как специфического, так и фонового сигнала регистрировались с казеиновым буфером в диапазоне концентраций 2–5 %. При использовании данного блокирующего агента количество антител в исследуемой сыворотке соответствовало титру 1:6400. Высокую блокирующую способность казеина объясняют небольшим размером белковых частиц, эффективно связывающихся с вакантными сайтами иммуносорбента. Таким образом, нами было показано, что блокирующий буфер, содержащий 2 % казеина, является наиболее эффективным и целесообразен в использовании с экономической точки зрения.

Литература

Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, et al. 2021. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. Clin Microbiol Rev 34: e00228–20.