

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА СВИНЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Матевосян К.Ш.¹, Степанова И.И.², Алексанкина В.В.³, Алексанкин А.П.⁴,
Козловский Ю.Е.⁵ Email: Matevosyan652@mail.ru

¹Матевосян Каринэ Шагеновна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник;

²Степанова Ирина Ильдаровна – научный сотрудник;

³Алексанкина Валентина Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;

⁴Алексанкин Андрей Павлович – кандидат биологических наук, научный сотрудник,
лаборатория патологии репродукции;

⁵Козловский Юрий Евгеньевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией,
лаборатория инфекционной патологии и молекулярной микроэкологии,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Научно-исследовательский институт морфологии человека,
г. Москва

Аннотация: гормональные гонадотропные препараты широко применяются в животноводческой практике для регулирования воспроизводительной функции животных, коррекции функциональных расстройств репродуктивной системы, получения суперовуляции у самок-доноров, сокращения сервис-периода, что повышает рентабельность в условиях интенсивного животноводства. Одним из наиболее доступных и часто применяемых гонадотропинов гипофизарного происхождения является фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллитропин) свиньи. Физиологическая роль ФСГ заключается в регуляции функции половых желез. При этом он действует совместно с ЛГ и усиливает секрецию половыми железами эстрогенов и андрогенов, повышает чувствительность половых желез к ЛГ. У самок ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках, а в последующем овуляцию и развитие желтых тел. У самцов ФСГ регулирует развитие и созревание сперматозоидов в семенниках. Определение концентрации ФСГ в крови животных может быть полезным при отборе высокопродуктивных особей маточного поголовья свиней. При регулировании воспроизводительной функции и синхронизации охоты сельскохозяйственных животных важно точно определять концентрацию вводимого препарата и проводить мониторинг его содержания в крови стимулируемых особей. Нами разработана тест-система для определения концентрации ФСГ свиньи в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа по «сэндвич»-типу на основе оригинальных мышинных моноклональных антител против ФСГ свиньи. Антитела, использованные в тест-системе, являются видоспецифичными и не реагируют с другими гонадотропными гормонами, что обеспечивает высокую специфичность системы и точность получаемых результатов. Технические характеристики тест-системы являются удовлетворительными: чувствительность не более 0,3 нг/мл, тесты на «открытие» и «линейность» в пределах 90-110%, коэффициент вариации для образцов с низкими, средними и высокими значениями содержания гормона не превышает 8%. Разработанная тест-система не имеет аналогов в Российской Федерации и может найти применение в ветеринарии и животноводстве.

Ключевые слова: ФСГ свиньи, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, тест-система.

DEVELOPMENT OF ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE PORCINE FOLLICLE-STIMULATING HORMONE IN BIOLOGICAL LIQUIDS

Matevosyan K.Sh.¹, Stepanova I.I.², Aleksankina V.V.³, Aleksankin A.P.⁴, Kozlovsky
Y.E.⁵

¹Matevosyan Karine Shagenovna - PhD in Medicine, Leading Researcher;

²Stepanova Irina Ildarovna – Research Officer;

³Aleksankina Valentina Viktorovna - PhD in Biology, Senior Researcher

⁴Aleksankin Andrey Pavlovich - PhD in Biology, Research Officer,
LABORATORY OF REPRODUCTIVE PATHOLOGY;

⁵Kozlovsky Yuri Evgenievich - PhD in Biology, Head the Laboratory,
LABORATORY OF INFECTIOUS PATHOLOGY AND MOLECULAR MICROECOLOGY,
FEDERAL STATE BUDGETARY SCIENTIFIC INSTITUTION
RESEARCH INSTITUTE OF HUMAN MORPHOLOGY,
MOSCOW

Abstract: hormonal gonadotropic drugs are widely used in animal husbandry practice for regulating the reproductive function of animals, correcting functional disorders of the reproductive system, obtaining superovulation in donor females, reducing the service period, which increases profitability in conditions of intensive animal husbandry. One of the most accessible and frequently used gonadotropins of pituitary origin is porcine follicle-stimulating hormone (pFSH, follitropin). The physiological role of FSH is to regulate the function of the sex glands. At the same time, it acts in conjunction with LH and enhances the secretion of the estrogen and androgen genital glands, increases the sensitivity of the sex glands to LH. In females, FSH stimulates the growth and maturation of follicles in the ovaries, and later ovulation and development of the corpus luteum. In males, FSH regulates the development and maturation of spermatozoa in the testes. Determining the concentration of FSH in the blood of animals may be useful in the selection of highly productive specimens of pigs. It's important to accurately determine the concentration of the injected drug and monitor its content in the blood of stimulated individuals for regulating the reproductive function and synchronizing the hunting of farm animals. We have developed a test-system for determining the concentration of porcine FSH in biological fluids by enzyme-linked immunosorbent sandwich assay (ELISA) based on the original mouse monoclonal antibodies against porcine FSH. The antibodies used in the test-system are specific and unreacted with other gonadotropic hormones, which ensures a high system specificity and accuracy of the results. The technical characteristics of the test system are satisfactory: sensitivity is not more than 0.3 ng/ml, tests for "opening" and "linearity" within 90-110%, the coefficient of variation for samples with low, medium and high hormone levels does not exceed 8% The developed test system has no analogues in the Russian Federation and can be used in veterinary medicine and animal husbandry.

Keywords: porcine follicle-stimulating hormone, monoclonal antibodies, ELISA, test system.

Введение

Гормональные гонадотропные препараты широко применяются в животноводческой практике для регулирования воспроизводительной функции животных, стимуляции роста фолликулов, овуляции и образования желтых тел, что приводит к синхронизации половой охоты у маточного поголовья. Гонадотропины применяют также для коррекции функциональных расстройств репродуктивной системы, получения суперовуляции у самок-доноров, сокращения сервис-периода. Своевременное покрытие животных в оптимальный период повышает рентабельность в условиях интенсивного животноводства [3].

Получают гонадотропные препараты для целей животноводства либо из сыворотки крови жеребых кобыл, либо из гипофиза различных сельскохозяйственных животных. Препараты первой группы могут вызывать нежелательные побочные явления, проявляющиеся в виде анафилактики. Для получения требуемого эффекта необходимы высокие дозы препаратов, приводящие к образованию крупных фолликулов с кровоизлияниями, множественных желтых тел и кист яичников. Длительный период полураспада препаратов приводит к накоплению в организме животных экзогенных гормонов, и как следствие, изменению гормонального статуса. Яичники таких животных находятся в состоянии гиперстимуляции, изменяется нормальное развитие гамет и степень оплодотворяемости, что приводит к дегенеративным изменениям зародышей. В связи с этим многократное использование препаратов из сыворотки крови жеребых кобыл нежелательно [6]. Препараты гипофизарного происхождения не вызывают аллергических реакций и обладают коротким периодом полураспада. При длительном применении таких препаратов не наблюдается заметных нарушений в репродуктивной системе животных и сохраняется чувствительность яичников к гонадотропинам [6].

Одним из наиболее доступных и часто применяемых гонадотропинов гипофизарного происхождения является фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллитропин) свиньи. ФСГ – это гонадотропный гормон передней доли гипофиза, который представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 30 кД, состоящий из α - и β -субъединиц [1]. α -ФСГ идентична α -субъединицам лютеинизирующего гормона (ЛГ), тиреотропного гормона (ТТГ) и кодируется одним геном для всех трех гормонов. β -ФСГ специфична для данного гормона и кодируется отдельным геном. Молекулы ФСГ человека и разных видов животных, обладая значительной гомологией, совпадают не полностью. Видовых различий в структуре α -субъединицы значительно больше, чем в структуре β -субъединицы [12]. ФСГ свиньи по своим антигенным свойствам значительно отличается от ФСГ человека, что, по-видимому, связано не только с отличием в аминокислотной последовательности полипептидных цепей, но также в особенностях их гликозилирования и состава олигосахаридных цепей [11]. Перекрестная реактивность моноклональных антител (МкАт) к ФСГ свиньи с гонадотропными гормонами человека не выявлена [2].

Физиологическая роль ФСГ заключается в регуляции функции половых желез. При этом он действует совместно с ЛГ и усиливает секрецию половыми железами эстрогенов и андрогенов, повышает чувствительность половых желез к ЛГ. У самок ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках, а в последующем овуляцию и развитие желтых тел. При недостаточном содержании ФСГ у

женских особей тормозятся рост и созревание фолликулов, развитие молочных желез. Самки не проявляют признаков половой охоты (инфантилизм), остаются бесплодными. У самцов ФСГ регулирует развитие и созревание сперматозоидов в семенниках. Недостаточность ФСГ у самцов сопровождается недоразвитием половых желез, торможением сперматогенеза, расстройствами роста и общего развития, недостаточной выраженностью вторичных половых признаков [12].

Определение концентрации ФСГ в крови животных может быть полезным при отборе высокопродуктивных особей маточного поголовья свиней. При регулировании воспроизводительной функции и синхронизации охоты сельскохозяйственных животных важно точно определять концентрацию вводимого препарата и проводить мониторинг его содержания в крови стимулируемых особей, так как показано, что при гиперстимуляции гонадотропинами возможно ингибирование проницаемости сосудов и нарушение имплантации [9].

Мы разработали количественную иммуоферментную тест-систему «ФСГ-свиньи-ИФА» на основе оригинальных мышинных моноклональных антител, продуценты которых получены ранее сотрудниками НИИ морфологии человека [2] и хранятся в коллекции института. Тест-система «ФСГ-свиньи-ИФА» предназначена для определения концентрации фолликулостимулирующего гормона свиньи в сыворотке крови и препаратах, изготавливаемых из сыворотки крови и гипофизов свиней.

Материалы и методы

Получение гибридных клеток–продуцентов мышинных моноклональных антител против ФСГ свиньи. Гибридные клеточные линии, продуцирующие МкАт против ФСГ свиньи, были получены в результате слияния клеток миеломной линии X63.Ag.8653 с лимфоцитами мышей линии BalB/c, иммунизированных ФСГ свиньи (Sigma #F-8001). Клеточные линии были помещены для длительного хранения в дюары с жидким азотом. Для разработки иммуоферментной тест-системы клеточные линии доставали из хранилища, культивировали и проводили характеристику продуцируемых ими МкАт.

Хранение гибридных клеток. Гибридные клетки для длительного хранения закладывали в дюары с жидким азотом. Клетки ресуспендировали в среде для хранения на основе культуральной среды RPMI-1640 с глутамином, содержащей 50% бычьей фетальной сыворотки и 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Суспензию объемом 1 мл и концентрацией 2 млн клеток в мл вносили в пластиковые флаконы на 2 мл для хранения в жидком азоте. Флаконы с суспензией помещали в пенопластовую упаковку и ставили на сутки в морозильную камеру при -70 °С, затем флаконы быстро доставали из пенопластовых упаковок и помещали в дюары, содержащие жидкий азот. Для получения моноклональных антител флаконы с гибридными клетками-продуцентами доставали из жидкого азота, быстро размораживали при 37 °С, осаждали центрифугированием при 1500 g и отмывали культуральной средой RPMI-1640 с глутамином.

Культивирование гибридных клеток. Культивировали гибридные клетки в условиях CO₂-инкубатора при 5% CO₂ и 37 °С в малых культуральных матрасах в объеме 10-12 мл культуральной среды RPMI-1640 с глутамином до получения концентрации 10 млн. клеток в мл. Продукцию моноклональных антител определяли в культуральной среде при проведении иммуоферментного анализа на 96-луночных полистироловых планшетах (Корея, SPL Maxibinding #38296) с иммобилизованным на дне лунок ФСГ свиньи, в качестве детектора использовали конъюгат пероксидазы хрена с козьими антителами против иммуноглобулинов мыши (Invitrogen #62-6520). Результат реакции учитывали по изменению окраски хромогенного субстрата тетраметилбензидина (ООО «Диатех-ЭМ» #PM-01)

Получение и очистка моноклональных антител. Гибридные клетки переносили из культуральных матрасов в центрифужные пробирки, осаждали центрифугированием при 1500 g и ресуспендировали в культуральной среде до концентрации 2 млн. клеток в мл. Мышам линии BalB/C внутрибрюшинно вводили 1 мл клеточной суспензии. После развития асцита внутрибрюшную жидкость откачивали и из неё получали фракцию иммуноглобулинов. Очистку иммуноглобулинов из асцитической жидкости проводили в несколько последовательных этапов. Нативную внутрибрюшную жидкость разводили в 2 раза PBS и к полученному раствору добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, оставляли на 2 часа при 4 °С, а затем центрифугировали при 5000 g в течение 40 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в PBS до конечного объема равного начальному объему нативного асцита. Полученную фракцию (сульфатную) диализовали в течение ночи против PBS. Затем проводили аффинную очистку сульфатной фракции на колонке с А-протеином (Healthcare #17-0402).

Характеристика моноклональных антител. Определяли субкласс МкАт в иммуоферментной реакции с антителами против субклассов мышинных иммуноглобулинов (Sigma #ISO2-1КТ), специфичность взаимодействия с ФСГ свиньи и другими гонадотропинами млекопитающих, а также локализацию эпитопа, с которым взаимодействовали МкАт.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блоттинг. Чистоту препарата МкАт на каждом этапе фракционирования определяли при проведении электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и при восстановлении дисульфидных связей (Кондратьева и др., 2004). Электрофорез проводили в 5% концентрирующем и 10% разделяющем ПААГе

в присутствии додецилсульфата натрия. Локализацию эпитопа, с которым взаимодействуют МкАт, на молекуле ФСГ свиньи выявляли с помощью вестерн-блоттинга. Проводили электрофоретическое разделение в ПААГе белков препарата ФСГ свиньи, затем белковые полосы из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare Amersham) в камере для блоттинга и после инкубации с МкАТ проявляли конъюгатом пероксидазы хрена с антителами козы против мышинных иммуноглобулинов в ферментативной реакции. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в течение 1 ч при 250 мА. Мембрану инкубировали в течение 1 часа в растворе, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, bovine serum albumin, MP #160069) и 0,05% твина (Polysorbate 20, Panreac #14076.1611), на основе PBS для предотвращения неспецифической сорбции. После промывания несколькими порциями PBS с 0,05% твина мембрану инкубировали с исследуемыми МкАт, а затем с конъюгатом пероксидазы хрена с антителами козы против мышинных иммуноглобулинов. После отмычки мембраны от конъюгата полосы визуализировали обработкой раствором тетраметилбензидина с перекисью водорода. В качестве маркера молекулярной массы использовали Protein Ladder (Page Ruler, Thermo Scientific #26616).

Антиген и приготовление стандартов для тест-системы. Стандарты для иммуноферментной тест-системы готовили на основе стабилизирующего буфера для длительного хранения белков (ООО Диатех-ЭМ #PM-03). В стабилизирующий буфер вносили ФСГ свиньи и получали точки шкалы в необходимых диапазонах концентраций.

Иммобилизация моноклональных антител на полистироловые планшеты. Для приготовления твердой фазы иммуноферментной тест-системы в лунки 96-луночных полистироловых планшетов вносили по 100 мкл раствора МкАт против ФСГ свиньи в PBS в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Затем содержимое лунок удаляли, вносили в лунки планшета по 200 мкл 1% раствора BSA в PBS для блокирования свободных сайтов на полистироле и инкубировали в течение суток при 4 °С. Затем раствор альбумина удаляли из лунок, а планшет либо сразу использовали для проведения иммуноферментного анализа, либо оставляли на воздухе при комнатной температуре в течение суток для полного высыхания лунок и затем упаковывали в пакеты из фольги для дальнейшего хранения.

Подбор пары моноклональных антител для количественного иммуноферментного анализа по сэндвич типу. Выбор оптимальной пары МкАт для разработки тест-системы проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа по сэндвич-типу. Исследуемые МкАт иммобилизовали на поверхность лунок полистироловых планшетов, а также готовили конъюгат пероксидазы хрена с такими же МкАт. Проводили иммуноферментную реакцию и выявляли пары МкАт, способные одновременно взаимодействовать с молекулой гормона.

Приготовление конъюгата моноклональных антител с пероксидазой хрена. Конъюгат пероксидазы хрена с МкАт готовили по методу Nakane [10] с некоторыми модификациями [7]. При окислении перйодатом натрия углеводных составляющих в пероксидазе возникают активные альдегидные группы, образующие основания Шиффа с аминокруппами иммуноглобулинов. Для остановки реакции и стабилизации оснований Шиффа конъюгат обрабатывали боргидридом натрия.

Результаты и обсуждение

Из хранилища были подняты 20 клонов гибридных клеток, полученных при иммунизации мышей ФСГ свиньи. При культивировании обнаружено, что способность к продукции МкАт сохранилась только у 15 клонов. Образцы культуральной жидкости от каждого клона были исследованы на содержание МкАт, специфически взаимодействующих с ФСГ свиньи, а также ХГЧ человека, ТТГ человека, ФСГ человека, ФСГ овцы, ЛГ человека, ЛГ овцы, ЛГ свиньи, ЛГ и ФСГ коровы. Все исследованные клоны продуцировали иммуноглобулины, относящиеся к классу G подклассу 1b, специфически взаимодействующие только с ФСГ свиньи. Антител, взаимодействующих с другими гонадотропными и гипофизарными гормонами, не обнаружено. Для получения чистой фракции мышинных иммуноглобулинов культура гибридных клеток каждого из 15 клонов была введена мышам линии Balb/C. Образовавшаяся асцитическая жидкость была подвергнута сульфатному фракционированию и аффинной хроматографии. Чистые препараты каждого клона МкАт были иммобилизованы на полистироловых планшетах. Также были приготовлены конъюгаты пероксидазы хрена с очищенными иммуноглобулинами. При проведении блоттинга обнаружено, что 11 клонов синтезируют МкАт против β -ФСГ и 4 клона против α -ФСГ.

Из 15 исследованных клонов выявлена только одна пара МкАт – клон G2 и G22, способных одновременно взаимодействовать с молекулой ФСГ свиньи в твердофазном иммуноферментном анализе по сэндвич-типу. Оба клона специфически взаимодействовали с субъединицей β -ФСГ, что было подтверждено в вестерн-блоттинге. Для повышения чувствительности тест-системы клон МкАт с более высокой аффинностью на твердой фазе G2 был выбран в качестве нижних антител для иммобилизации на планшет, а G22 в качестве верхних антител для приготовления конъюгата с пероксидазой хрена.

Для определения рабочих характеристик тест-системы подбирали оптимальные условия сорбции нижних антител и выявляемый диапазон концентраций гормона. Стандартные точки шкалы готовили путем разведения препарата ФСГ свиньи от концентрации 100 мкг/мл до 10 пг/мл с шагом в 10 раз в стабилизирующем буфере. В результате было получено 9 стандартных точек включая нулевую, которая не содержала гормон (0; 10 пг/мл; 100 пг/мл; 1 нг/мл; 10 нг/мл; 100 нг/мл; 1 мкг/мл; 10 мкг/мл; 100 мкг/мл). При проведении ИФА выявили, что зависимость между значениями оптической плотности и концентрацией ФСГ свиньи наблюдалась в диапазоне от 1 нг/мл до 10 мкг/мл. До 1 нг/мл и после 10 мкг/мл значения оптической плотности выходили на плато.

По данным специализированной литературы физиологические значения концентрации ФСГ у половозрелых свиней изменяются в диапазоне от 0,7 до 7 нг/мл [8], что входит в диапазон физиологической нормы и у человека. Таким образом, при подборе условий проведения ИФА учитывали необходимость получения чувствительности системы не более 0,5 нг/мл. Титрование сорбированных на планшете МкАт клона G2 и конъюгата МкАт клона G22 с пероксидазой хрена проводили в шахматном порядке для концентраций гормона 0 нг/мл, 1 нг/мл, 20 нг/мл. В результате посадочная концентрация 5 мкг/мл МкАт клона G2 была определена как оптимальная.

Для построения калибровочной кривой в количественном варианте иммуноферментного анализа ФСГ свиньи в биологических жидкостях были приготовлены жидкие калибровочные стандарты на основе стабилизирующего буфера, содержащие известные концентрации гормона: 0 нг/мл; 0,75 нг/мл; 1,5 нг/мл; 3 нг/мл; 6 нг/мл; 12 нг/мл; 25 нг/мл; 50 нг/мл. Рабочий раствор конъюгата МкАт клона G22 с пероксидазой хрена готовили также в стабилизирующем буфере. Качественные и количественные характеристики калибровочных стандартов, рабочего раствора конъюгата и 96-луночных полистироловых планшетов с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок специфическими МкАт к ФСГ свиньи были стабильны в течение времени не менее 6 месяцев хранения.

Для проведения анализа в лунки планшета с А1 по Н2 вносили в дублях по 100 мкл калибровочных стандартов. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови свиньи вносили в дублях по 100 мкл в свободные лунки планшета. Закрывали планшет самоклеящейся пленкой и инкубировали в течение 60 минут в темноте при температуре 37 °С. По окончании инкубации удаляли содержимое лунок декантированием и промывали лунки 4 раза раствором PBS с 0,05% твином по 200 мкл в лунку. Вносили во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Закрывали планшет пленкой самоклеящейся и инкубировали в течение 60 мин в темноте при температуре 37 °С. По окончании инкубации удаляли содержимое лунок и промывали 4 раза раствором PBS с 0,05% твином. Затем вносили во все лунки по 100 мкл субстратно-хромогенной смеси с тетрабензидином. Планшет закрывали пленкой самоклеящейся и инкубировали при температуре 37 °С в течение 10 минут в темноте. Затем вносили 1М серную кислоту по 100 мкл в лунку. Фотометрию проводили на спектрофотометре («Униплан» НПО «Пикон») вертикального сканирования для 96-луночных планшетов при длине волны 450 нм сразу после остановки реакции. После проведения фотометрии вычисляли среднее значение единиц оптической плотности (ЕОП) лунок для каждого дубля. Значение ЕОП раствора в лунках планшета после ИФА было прямо пропорционально концентрации гормона во вносимом растворе в диапазоне точек шкалы (0 – 50 нг/мл).

На рисунке 1 представлен типичный график калибровочной кривой для определения концентрации ФСГ свиньи в разрабатываемой тест-системе ИФА.

Для технической характеристики разрабатываемой тест-системы были определены показатели, рекомендуемые в Методическом руководстве по проведению контроля качества наборов реагентов для иммуноферментного анализа [5], а именно чувствительность, специфичность, тест на «открытие», тест на «линейность» и контроль воспроизводимости результатов. Чувствительность тест-системы составляла не более 0,3 нг/мл и представляла наименьшую концентрацию ФСГ свиньи, определяемую данной тест-системой. Величину чувствительности рассчитывали на основании определения среднеквадратичного отклонения значений оптической плотности (ОП) калибровочной пробы, не содержащей исследуемое вещество, и на основании определения значений ОП калибровочной пробы с наименьшим содержанием гормона [5]. Высокая специфичность тест-системы определялась специфическими МкАт на основе которых она была разработана. Тест «на открытие» представлял собой определение количества ФСГ свиньи в образце, полученном при смешивании равных объемов калибровочной пробы и анализируемого образца сыворотки крови свиньи с известной концентрацией ФСГ. Величина теста на «открытие» находилась в допустимых пределах от 90 до 110%. Тест на «линейность» заключался в последовательных разведениях калибровочных проб, содержащих гормон, нулевой пробой, не содержащей ФСГ свиньи, с последующим сравнением полученных результатов в ИФА с ожидаемыми при таком разведении. Величины теста на «линейность» находились в допустимых пределах от 90 до 110 %. Воспроизводимость результатов ИФА оценивали при определении коэффициента вариации, который отражает зависимость между разбросом и среднеарифметическим значением, получаемым при многократном измерении одного и того же образца. При проведении этого теста использовали образцы с

низким (1-4 нг/мл), средним (5-10 нг/мл) и высоким (15-30 нг/мл) содержанием ФСГ свиньи. Коэффициент вариации во всех случаях не превышал 8%.

Таким образом, нами разработана тест-система для определения концентрации ФСГ свиньи в биологических жидкостях методом твердофазного иммуоферментного анализа по «сэндвич»-типу на основе оригинальных мышинных моноклональных антител против ФСГ свиньи. МкАт, использованные в тест-системе, являются видоспецифичными и не реагируют с другими гонадотропными гормонами, что обеспечивает высокую специфичность системы и точность, получаемых результатов. Технические характеристики тест-системы являются удовлетворительными. Разработанная тест-система не имеет аналогов в Российской Федерации и может найти применение в ветеринарии и животноводстве.

Список сокращений:ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, фоллитропин; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ТТГ – тиреотропный гормон; МкАт – моноклональные антитела; ИФА – иммуоферментный анализ; ДМСО – диметилсульфоксид; PBS – натрий-фосфатный буфер (Phosphate buffered saline); ПААГ – полиакриламидный гель; BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin); ЕОП – единицы оптической плотности; ОП – оптическая плотность

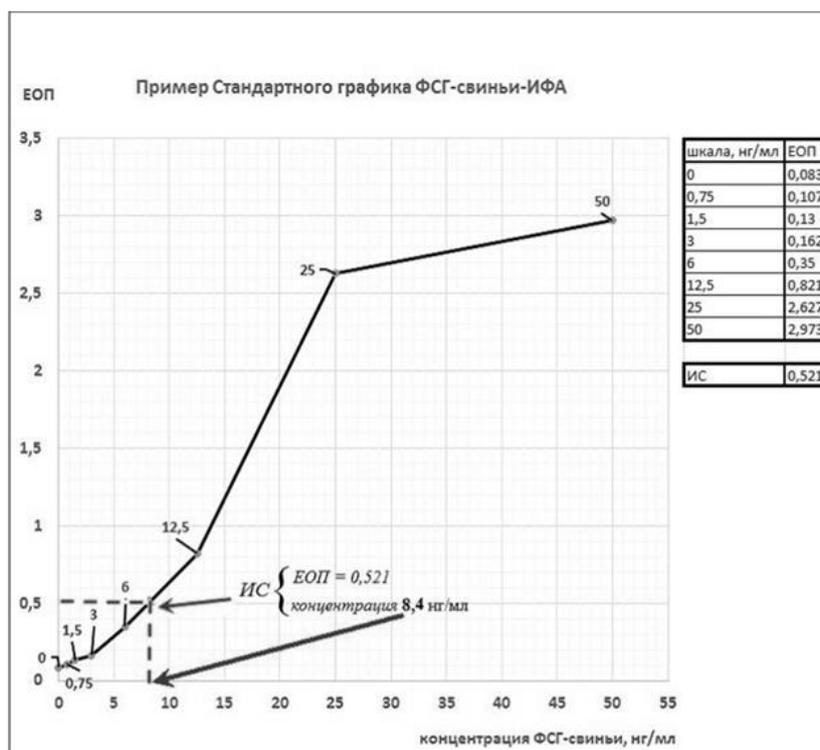


Рис. 1. График калибровочной кривой, построенной по калибровочным стандартам, в ИФА для определения концентрации ФСГ свиньи в биологических жидкостях.

ЕОП – единицы оптической плотности, ИС – исследуемая сыворотка, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, ИФА – иммуоферментный анализ, шкала – значения концентрации гормона в калибровочных стандартах

Список литературы

1. Алейникова Т.Л., Авдеева Л.В. Андрианова Л.Е. и др. Биохимия: Учеб. для вузов (под ред. Е.С. Северина). М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. 779 с. ISBN 5-9231-0254-4.
2. Вербицкий М.Ш., Фидлер Р., Матевосян К.М. и др. Моноклональные антитела к антигенам и гормонам репродуктивной системы: использование в иммунологии репродукции // Иммунология, 1994. № 4. С. 26-30.
3. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Л.: Агропромиздат Лен. отд., 1989. 610 с.
4. Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Егорова С.Г. и др. Практикум по иммунологии. М.: Академия, 2004. 272 с.
5. Тигранян Р.А., Калита Н.Ф., Rogанов А.С. Методическое руководство по проведению контроля качества наборов реагентов для иммуоферментного анализа. Министерство Здравоохранения и Медицинской Промышленности РФ, Москва, 1994. 33 с.
6. Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных. М.: ВО Агропромиздат, 1989. С. 88-93.

7. *Elwell K., Howard G.C.* Chemically Modifying Antibodies // Basic Methods in Antibody Production and Characterization (Eds Gary C. Howard, Delia R. Bethell), 2001 by CRC Press LLC. Chapter 14. P. 199-215.
8. *Knox R.V.* Recent advancements in the hormonal stimulation of ovulation in swine.// *Vet Med (Auckl)*. 2015 Oct 5;6:309-320. doi: 10.2147/VMRR.S68960.
9. *Kramer B.* Changes in vascular permeability and deciduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins // *Anat Rec.*, 1997 Jan; 247(1):20-4.
10. *Nakane P.K., Kawaoi A.J.* Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. // *J. Histochem Cytochem.*, 1974 Dec; 22 (12):1084-91. DOI: 10.1177/22.12.1084.
11. *Papkoﬀ H.* Chemistry of the gonadotropins // *Reproduction in Domestic Animals*. 2nd Edition (Eds Cole H.H., Cupps P.T.). eBook ISBN: 9781483263151 Imprint: Academic Press Published Date: 1st January 1969. 684 p. (P. 70-72).
12. *Pierce J.G., Parsons T.F.* Glycoprotein hormones: structure and function // *Annu Rev Biochem.* 1981; 50:465-95. DOI:10.1146/annurev.bi.50.070181.002341.