

ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ И СВОЙСТВА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ С МЕТКОЙ ALEXA-488 ДЛЯ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

М.Е. Копырулина, Е.Н. Захарова, Т.Н. Заботина, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Марина Евгеньевна Копырулина marina.kopyrulina@mail.ru

Введение. Получение флуоресцентных зондов на основе моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам лейкоцитов человека является актуальной задачей, решение которой даст возможность проводить научные и клинические исследования в области онкологии, гематологии, иммунологии, эпидемиологии.

Цель исследования — создание флуоресцентных зондов на основе МКА и флуоресцентного красителя Alexa-488 для анализа клеточных популяций и субпопуляций лейкоцитов человека методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. В работе использовали МКА к антигену В-лимфоцитов (клон ИКО-180) и флуоресцентный краситель Alexa-488 в форме активного моносукцинимидного эфира. МКА выделяли из асцитной жидкости мышей с привитой внутрибрюшинно гибридомой путем комбинированной очистки иммуноглобулиновой фракции каприловой кислотой и высаливания сульфатом аммония. Для очистки полученных конъюгатов (иммунофлуоресцентных зондов, ИФЗ) применяли гель-фильтрацию на колонке PD-10, концентрацию и плотность меченых ИФЗ определяли спектрофотометрически. Оценку биологической активности полученных ИФЗ проводили с использованием клеток периферической крови доноров в диапазоне концентраций МКА 0,5–100 мкг/мл. Определение рабочего титра ИФЗ проводили по методу титрования антител, предложенному C.C. Stewart.

Результаты. Экспериментально установлено оптимальное время инкубирования МКА с флуорофором. Получена панель ИФЗ с различной плотностью меченых Alexa-488. Для этого варьировали молярное соотношение МКА и флуорофора в среде реакции конъюгирования от 1:2 до 1:100. Оптимальная плотность меченых ИФЗ находится в диапазоне 5–13,5 М:М, концентрация антител — в диапазоне 5–25 мкг/мл. Для ИФЗ из МКА ИКО-180 с Alexa-488 такие высокие значения плотности меченых не приводят к снижению эффективности флуоресценции и антигенсвязывающей способности. Сравнительная характеристика специфической активности ИФЗ на основе МКА ИКО-180 и коммерческих ИФЗ (BD Biosciences) показала сопоставимые результаты.

Заключение. Оптимальными условиями для меченых МКА ИКО-180 красителем являются: карбонатный буфер с pH 8,3, концентрация антител в реакционной смеси 1 мг/мл, количество активного красителя 10–100 ммоль на 1 ммоль белка, время инкубирования 90 мин при температуре 18–25 °C.

Ключевые слова: моноклональные антитела, проточная цитометрия, иммунофлуоресцентные зонды, Alexa-488, конъюгаты моноклональных антител

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-70-75

THE TECHNOLOGY OF CREATION AND QUALITY TESTING OF IMMUNOFLUORESCENT PROBES WITH DYE ALEXA-488 FOR ANALYSIS OF CELULAR POPULATIONS BY FLOW CYTOMETRY

M.E. Kopyrulina, E.N. Zakharova, T.N. Zabolina, D.Yu. Blokhin, P.K. Ivanov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Fluorescent probes based on monoclonal antibodies (MAb) are widely used in scientific and clinical research in the field of oncology, hematology, immunology, epidemiology.

Objective: to create of fluorescent probes based on the MAb and the fluorescent dye Alexa-488 for the analysis of cellular populations by flow cytometry.

Materials and methods. MAb to B lymphocyte antigen (clone ICO-180), fluorescent dye Alexa-488 were used in the work. MAb was isolated from ascitic fluid by combined purification of the immunoglobulin fraction with caprylic acid and salting out with ammonium sulfate. Gel filtration on a PD-10 column was used to purify the conjugates (immunofluorescent probes, IFP), the concentration and labeling density of the IFP were determined spectrophotometrically. The determination of the working titer of the IFP was performed using the antibody titration method proposed by C.C. Stewart.

Results. The optimal time of incubation of MAb with a fluorophore was experimentally determined. The optimal conditions for labeling MAb of the ICO series with the dye are: a carbonate buffer with pH 8,3, the concentration of antibodies in the reaction mixture is 1 mg/ml, molar ratio of active dye — 10–100 mmol per 1 mmol of protein, the incubation time is 90 minutes, the temperature is 18–25 °C. We obtained a panel of conjugates of MAb with Alexa-488, differing in their different labeling densities. Evaluation of the biological activity of the resulting conjugates was carried out on peripheral blood cells of donors in the concentration range of MAb 0,5–100 µg/ml.

Conclusion. The optimal conditions for labeling MAb of the ICO series with the dye are: a carbonate buffer with pH 8,3, the concentration of antibodies in the reaction mixture is 1 mg/ml, the incubation time is 90 minutes, the temperature is 18–25 °C. The optimum density of labeling is in the range 5–13,5 M:M, the optimal concentration of antibodies is in the range of 5–25 µg/ml.

Key words: monoclonal antibodies, flow cytometry, fluorescent probes, Alexa-488, monoclonal antibodies conjugates

Введение

В настоящее время установлено, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [1].

Оценка состояния иммунной системы онкологических больных проводится на основании субпопуляционного состава клеток периферической крови (посредством иммунофенотипирования) и анализа функциональной активности иммунокомпетентных клеток [2]. Иммунофенотипирование выполняют методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКА) к дифференцировочным антигенам лейкоцитов. Возможности этого метода прямо зависят от разнообразия и свойств применяемых иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ), которые получают посредством химического конъюгирования специфических для отдельных антигенов МКА с молекулами флуорофоров. Выбор пригодных для цитометрического анализа флуорофоров прямо связан с конструкцией цитометра, в первую очередь с длиной волны возбуждающего флуоресценцию лазера, а также со спектральными диапазонами каналов регистрации флуоресцентного сигнала. Жесткие характеристики допустимых длин волн возбуждающего и регистрируемого света существенно ограничивают перечень флуорофоров, пригодных для изготовления ИФЗ. Традиционно для получения ИФЗ используют низкомолекулярный флуоресцеин (в виде активного изотиоцианатного производного FITC), а также флуоресцентные белки растительного происхождения фикоэритрин и аллофикоцианин. Таким же требованиям к их спектральным характеристикам соответствуют некоторые синтетические красители, полученные основателем компании Molecular Probes (США) R.P. Haugland и известные под общим наименованием Alexa-fluor. Для них характерны устойчивость к «выгоранию» и изменению pH, высокий квантовый выход флуоресценции и гидрофильность [3, 4].

В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (ранее Российский онколо-

гический научный центр) им. Н.Н. Блохина получены и охарактеризованы МКА серии ИКО, составляющие панель антител к широкому спектру антигенов дифференцировки лейкоцитов человека [5–7]. Эти МКА в течение ряда лет применяются в научных и клинических исследованиях для выполнения как не прямой (с использованием «сэндвича» из нативных первичных МКА и вторичных «проявляющих» ИФЗ — флуоресцентных конъюгатов поликлональных антител к суммарным иммуноглобулинам мыши), так и прямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

Цель настоящего исследования — создание флуоресцентных зондов на основе МКА и флуоресцентного красителя Alexa-488 для анализа популяций и субпопуляций лейкоцитов человека методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали: МКА клона ИКО-180 к антигену CD20 В-лимфоцитов человека (аналог фирмы BD Biosciences — leu16) производства ООО «НПЦ МедБиоСпектр» (Россия); контрольную панель составляли ИФЗ производства BD Biosciences (США): CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE, CD16-FITC, CD20-FITC, CD20-PE; флуоресцентный краситель Alexa-488 производства Invitrogen (США) в форме моносукцинимидного эфира. Максимум поглощения красителя составляет 494 нм, максимум эмиссии — 517 нм, молекулярная масса красителя — 643 Да.

Дополнительные материалы, необходимые для получения ИФЗ: хроматографическая колонка PD-10 (GE Healthcare Life Sciences, США); фосфатно-солевой буфер (ООО «ПанЭко», Россия) готовили по инструкции производителя, pH готового раствора 7,4; азид натрия (Sigma-Aldrich): 10 % водный раствор; диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma-Aldrich); лизирующий раствор FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США).

Доноры. В качестве исследуемого материала использовали периферическую кровь здоровых лиц в возрасте от 27 до 53 лет (11 женщин, 9 мужчин). Кровь забирали из локтевой вены натошак, в качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту.

Методы. МКА получали методом гибридной технологии с использованием ранее созданных линий гибридных клеток, продуцирующих эти антитела. МКА выделяли из асцитной жидкости мышей BALB/c с инокулированной внутрибрюшинно гибридомой, продуцирующей МКА.

МКА выделяли путем комбинированной очистки иммуноглобулиновой фракции с использованием каприловой кислоты и высаливания белка сульфатом аммония.

Для этого точно измеренный объем асцитной жидкости разводили в 5 раз 0,06 М ацетатным буфером (рН 4,0), центрифугировали при ускорении 350 g в течение 10 мин. К надосадочной жидкости медленно (по капле) добавляли каприловую кислоту из расчета 25 мкл на 1 мл супернатанта и инкубировали при постоянном встряхивании в течение 30 мин. Смесь центрифугировали 30 мин при ускорении 350 g и температуре +4 °С. Затем супернатант фильтровали, доводили рН до 7,4 и охлаждали в течение 30 мин в холодильной камере при +6 °С. К охлажденному супернатанту добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, смесь перемешивали и инкубировали в течение 1 ч. Осадок, полученный после центрифугирования смеси (350 g, 10 мин), растворяли и переводили в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4) гель-фильтрацией на хроматографической колонке PD-10.

Концентрацию белка (C_{IgG}) измеряли спектрометрически и рассчитывали по формуле

$$C_{IgG} = OD_{280} / 1,4,$$

где OD_{280} — оптическая плотность раствора, измеренная при 280 нм.

В работе использовали спектрофотометр Ultra-spec 3100 pro Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Великобритания).

Оценку биологической активности полученных конъюгатов проводили с использованием клеток периферической крови доноров в прямой РИФ. Клетки крови здоровых доноров инкубировали с конъюгатами МКА в течение 20 мин при 18–25 °С в темноте. Эритроциты лизировали раствором FACS Lysing Solution. Несвязавшиеся МКА удаляли 2-кратной отмывкой фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и фиксировали образцы фосфатно-солевым буфером с содержанием 0,4 % формальдегида.

В работе использован проточный двулучевой цитометр FACSCalibur (BD Biosciences, США) с программным пакетом CellQuest. Флуоресценцию учитывали в спектральных диапазонах 512–547 нм (FL1 для FITC, Alexa-488), 575–595 нм (FL2 для фикоэритрина). Для анализа клеточных популяций учитывали также показатели прямого малоуглового и бокового

светорассеивания, на основании которых выполняли гейтирование — программное «выделение» субпопуляции лимфоцитов и дискриминацию иных субпопуляций. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов.

Статистическая обработка данных. Использовалось программное обеспечение Sigma Plot 11.0 для Windows. Для определения достоверности корреляционной связи между данными, полученными с применением эталонных реагентов и экспериментальных флуоресцентных зондов, рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Все результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты

Получение конъюгатов МКА с флуорофором Alexa-488. В методической статье создателя флуорофора Alexa-488 и в общем лабораторном руководстве компании Molecular Probes подробно описаны протоколы получения конъюгатов МКА с красителем, в соответствии с которыми следует придерживаться следующих условий проведения реакции: конъюгирование производят в карбонатном буфере (рН 8,3), концентрация МКА в реакционной смеси 1 мг/мл, температура 18–25 °С, время инкубирования 60–90 мин [8, 9]. Оптимальное молярное соотношение белка и красителя следует подбирать эмпирически, исходя из свойств конкретной белковой молекулы.

После внесения в реакционную смесь раствора моносукцинимидного эфира флуорофора до молярного соотношения с белком 40:1 смесь делили на 4 фракции (I, II, III, IV), которые инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, 1 ч, 1,5 ч и 2 ч соответственно. По окончании времени инкубации реакционную смесь немедленно наносили на колонку PD-10 или Sephadex G-25, уравновешенную фосфатно-солевым буфером (рН 7,4), для остановки реакции и отделения ее продуктов от несвязавшегося флуорофора. Спектрофотометрическое исследование очищенных конъюгатов при 2 длинах световых волн позволяет рассчитать плотность мечения и конечную концентрацию белка по формулам, представленным ниже.

Плотность мечения (D [dye]/ P [protein]) для Alexa Flour-488:

$$D/P = 3,1 \times (OD_{494}) / [OD_{280} - (0,11 \times OD_{494})].$$

Концентрация иммуноглобулина (C_{Ig}) в растворе конъюгата:

$$C_{Ig} = OD_{280} - (0,11 \times OD_{494}) / 1,4,$$

где OD_{280} , OD_{494} — оптические плотности раствора, измеренные при 280 и 494 нм соответственно.

Результаты спектрофотометрического анализа представлены в таблице.

Результаты спектрофотометрического исследования ИФЗ

Образец фракции, +18 °С	D/P	OD ₂₈₀	OD ₄₉₄
I (30 мин)	4,5	0,411	0,514
II (1 ч)	6,5	0,407	0,684
III (1,5 ч)	8,1	0,438	0,889
IV (2 ч)	7,9	0,443	0,882

Примечание. D/P — плотность мечения; OD₂₈₀, OD₄₉₄ — оптические плотности конъюгатов, измеренные при 280 и 494 нм соответственно; ИФЗ — иммунофлуоресцентный зонд.

Для получения ИФЗ с максимальной плотностью мечения необходимо инкубировать МКА с флуорофором в течение 90 мин при комнатной температуре. Увеличение времени инкубации до 2 ч не влияет на степень связывания белка с красителем. ИФЗ с разной плотностью мечения использовали для специфического окрашивания лимфоцитов периферической крови доноров CD20⁺. Все ИФЗ с концентрацией рабочего раствора антител 25 мкг/мл выявляют одинаковое количество антиген-позитивных клеток, однако обнаружено различие параметра S/N (сигнал/шум), рассчитанного как отношение средней интенсивности флуоресценции положительного пика

к интенсивности флуоресценции отрицательного пика (рис. 1).

Независимо от условий получения все ИФЗ показали сходную биологическую активность (количество положительных событий в РИФ). При этом регистрируемая интенсивность флуоресценции зависит от плотности мечения.

Для получения корректных и воспроизводимых результатов количественного анализа клеточных популяций в прямой РИФ используемые для нее ИФЗ должны иметь оптимальные характеристики, в том числе плотность мечения и рабочую концентрацию раствора зонда.

Плотность мечения зависит от условий реакции конъюгирования — времени реакции и молярного соотношения ее компонентов. В процессе варьирования соотношениями МКА и красителя в диапазоне от 1:2 до 1:100 М:М при оптимальных условиях, описанных выше, получили панель ИФЗ, значительно различающихся между собой по плотности мечения Alexa-488 — от 3,0 до 13,5 М:М.

Для определения рабочего титра растворов полученных ИФЗ использовали метод титрования антител, предложенный С.С. Stewart [10]. Метод основан на дробном разведении раствора ИФЗ с определением предельного значения фактора разведения, при котором в прямой РИФ еще сохраняется максимальная интенсивность флуоресценции антиген-позитивных клеток. Дальнейшее понижение концентрации

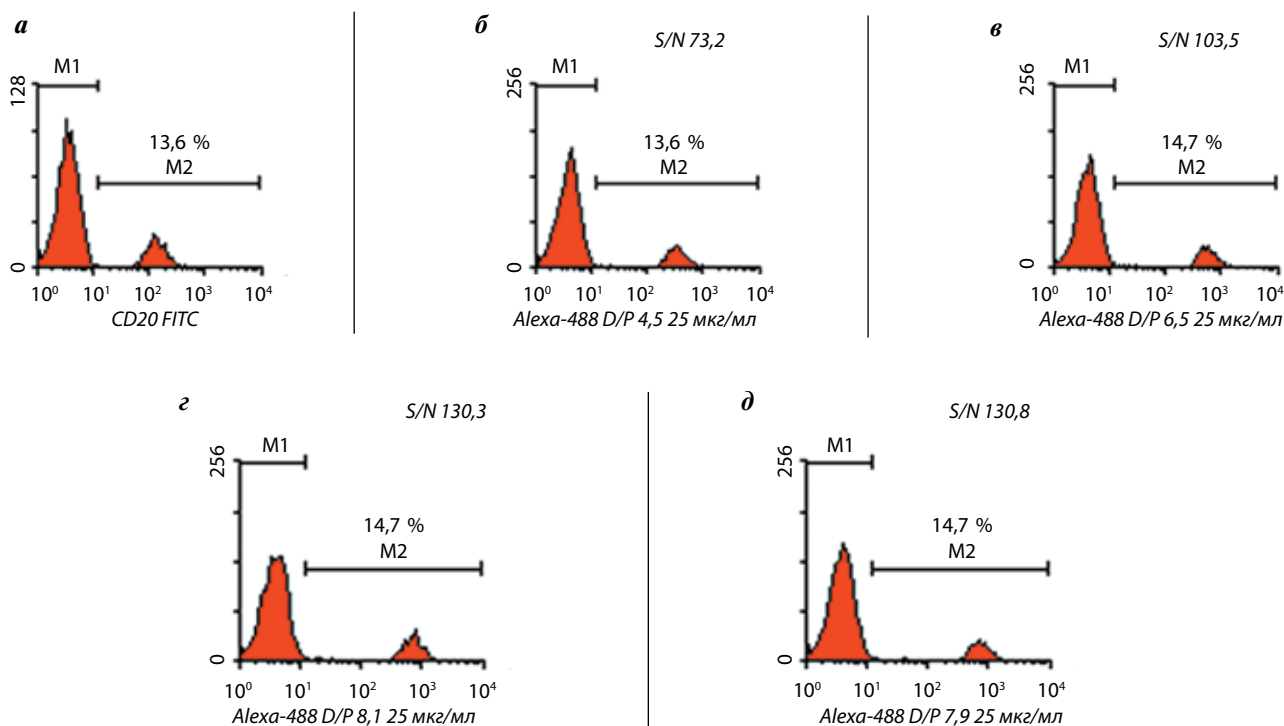


Рис. 1. Влияние условий получения ИФЗ на их антигенсвязывающую способность: а — инкубирование с контрольным реагентом CD20/FITC; б — инкубирование 30 мин, +18 °С; в — инкубирование 1 ч, +18 °С; г — инкубирование 1,5 ч, +18 °С; д — инкубирование 2 ч, +18 °С

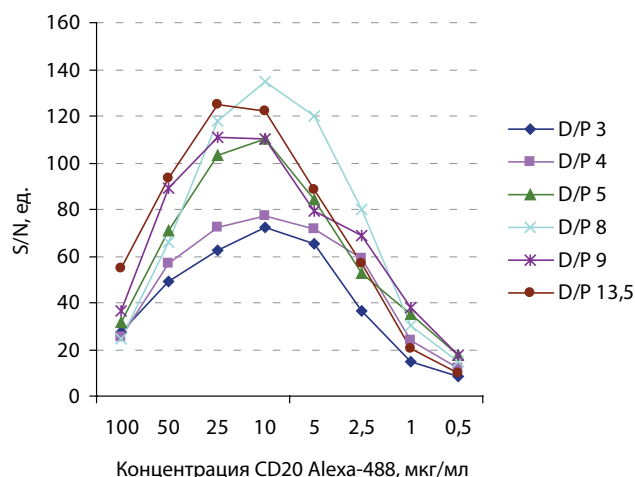


Рис. 2. Зависимость отношения специфического сигнала к шуму (S/N) от концентрации раствора ИФЗ с различной плотностью мечения (D/P)

зондов приводит к смещению антиген-позитивного пика на гистограмме влево и уменьшению соотношения S/N .

На рис. 2 приведены результаты исследования соотношения S/N при использовании ИФЗ с различной плотностью мечения в разведениях, соответствующих концентрации МКА в диапазоне 0,5–100 мкг/мл.

Наибольшие значения отношения S/N характерны для конъюгатов с плотностью мечения в диапазоне 5–13,5:1 М:М.

В случае применения в дальнейшем ИФЗ с плотностью мечения, равной 8:1 М:М, определялись диапазон рабочих концентраций этого зонда и сопоставимость получаемых результатов с результатами цитометрического анализа того же образца крови с использованием контрольного реагента – коммерческого продукта МКА CD20/FITC производства компании BD Biosciences (США). На рис. 3 представлены гистограммы распределения популяции лимфоцитов периферической крови донора, полученные с использованием ИФЗ в диапазоне концентраций 0,5–100 мкг/мл.

В диапазоне концентраций 1–100 мкг/мл гистограммы имеют вид, характерный для выявления на клетках антигена CD20, экспрессированного только на В-лимфоцитах. На гистограмме видно, что снижение концентрации зонда <2,5 мкг/мл приводит к смещению пика специфической флуоресценции (на рис. 3 справа) влево, следовательно, концентрация 2,5 мкг/мл является минимально допустимой для выполнения цитометрического анализа. При концентрациях зонда в диапазоне 5–25 мкг/мл в составе лимфоцитов периферической крови донора выявляется $\approx 16\%$ клеток CD20⁺, однако величина соотношения S/N максимальна при концентрации зонда 10 мкг/мл (рис. 4). Цитометрический анализ лимфоцитов того же образца крови, выполненный с ис-

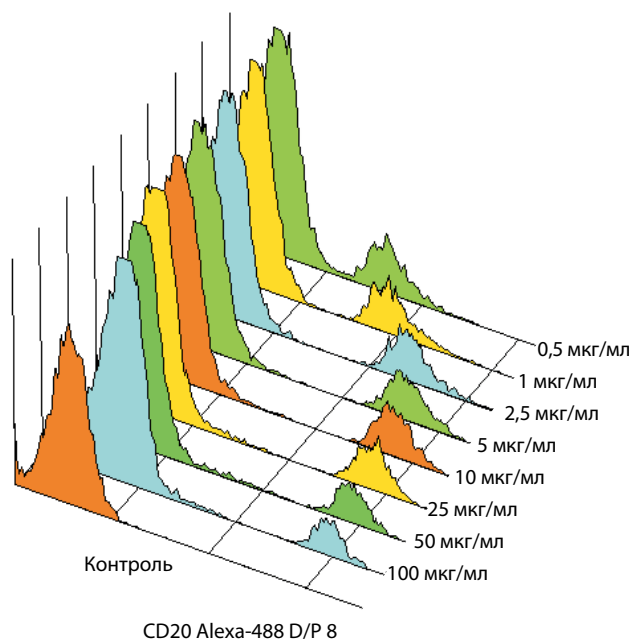


Рис. 3. Гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ с плотностью мечения (D/P) 8 в диапазоне концентраций 0,5–100 мкг/мл

пользованием контрольного реагента, выявил такое же содержание антиген-позитивных клеток, что подтверждает корректность цитометрического анализа с полученными нами ИФЗ.

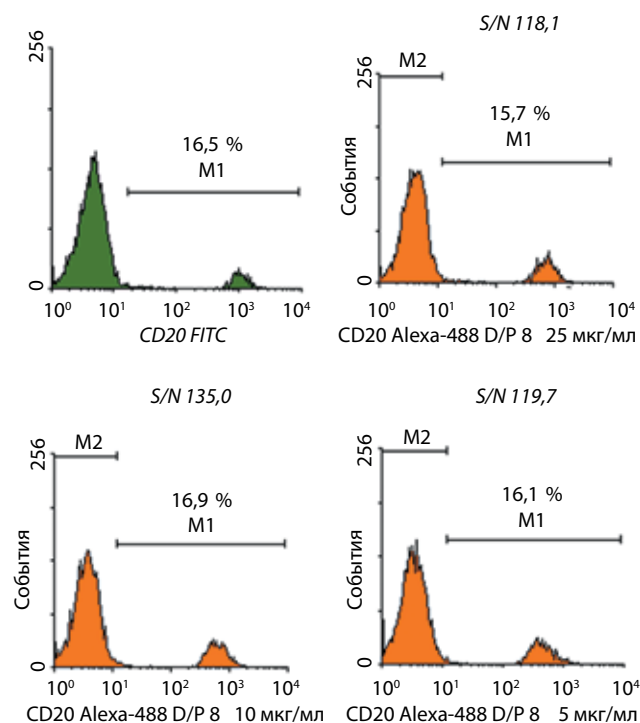


Рис. 4. Гистограммы распределения В-лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ с плотностью мечения (D/P) 8 в диапазоне концентраций 5–50 мкг/мл

Таким образом, полученные в результате конъюгирования МКА ИКО-180 с моносукцинимидным эфиром красителя Alexa-488 ИФЗ являются рабочими в диапазоне концентраций 2,5–100 мкг/мл, однако максимальные значения отношения S/N соответствуют концентрациям 5–25 мкг/мл, т. е. они являются оптимальными и рекомендуются для анализа клеточных популяций периферической крови методом проточной цитометрии.

Заключение

В результате исследования установлено, что использование красителя Alexa-488 для конъюгирования с МКА ИКО-180 позволяет добиться высоких значений плотности мечения (3–13,5:1 М:М), что соответствует ранее полученным данным J.E. Berlier и соавт. [3]. Вместе с тем столь высокие молярные соотношения не приводят к снижению эффективности флуоресценции ИФЗ и потере антигенсвязывающей способности МКА.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Levy E.M., Roberti M.P., Mordoh J. et al. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J Biomed Biotechnol* 2011;1–11. DOI: 10.1155/2011/676198.
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественно меланомой и раком молочной железы. *Иммунология* 2014;35(2):64–7.
3. Berlier J.E., Rothe A., Buller G. et al. Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1699–712. DOI: 10.1177/002215540305101214. PMID: 14623938.
4. Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J. et al. Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1179–88. DOI: 10.1177/002215549904700910. PMID: 10449539.
5. Барышников А.Ю., Фролова Е.А., Ленева Н.В. и др. Моноклональные антитела ICO-105 к рецептору интерлейкина-2 (антиген CD25). *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 1993;4(4):7–12.
6. Королева А.М., Барышников А.Ю., Виха Г.В. и др. Характеристика моноклональных антител ICO-116 к антигену CD16 естественных киллеров. *Биотехнология* 1993;61:11–2.
7. Барышников А.Ю., Блохина Н.Г., Кадагидзе З.Г. Моноклональные антитела ИКО-1 против константной части IA-подобных антигенов. *Экспериментальная онкология* 1984;6:123.
8. Haugland R.P. Antibody conjugates for cell biology. In: *Current protocols in cell biology*. Wiley & Sons, 2001. Unit 16.5.
9. Haugland R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 9th ed. Eugene, OR. Molecular Probes 2002. Section 1.3.
10. Stewart C.C., Stewart S.J. Four colour compensation. *Cytometry* 1999;38(4):161–75. PMID: 10440854.