

IL-2 тодорхойлох фермент холбоот эсрэгбиеийн оношлуур гарган авах технологийн судалгаа

Амарбаясгалан З.¹, Товуусүрэн Б.¹, Пүрэвдорж Б.¹, Чимидцэрэн С.²

¹Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль,

²Улсын нэгдүгээр төв эмнэлэг

Email: *Z.Amarbayasgalan2215@gmail.mn

Abstract

Production technology of IL-2 enzyme-linked immunosorbent assay

Amarbayasgalan Z.¹, Towuusuren B.¹, Purewdorj B.¹, Chimidtseren S.²

¹Mongolian National University of Medical Sciences,

²First Central Hospital of Mongolia

Email: *Z.Amarbayasgalan2215@gmail.com

Background

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit is used abundantly in order to measure the quantity of agents and their antibodies. Introducing the production of the kit in our own country for research and diagnostic uses will be beneficial for economy and time.

Goal

Producing enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of IL-2 cytokine in biological fluids.

Materials and Methods

Elisa kits made by R&D systems in USA were used in our study. Anti-IL-2 monoclonal antibody was diluted with concentrations of 0.5-3µg/ml in polystyrene well, and then incubated with conjugate solution of pH 7.2-7.4 for 12 hours with the purpose of measuring the optimal starting concentration for the conjugate antibody. Later, the reaction was blocked with PBS blocking buffer with 1% BSA (Bovine serum albumin) for an hour. After washing the wells, 100ul of standard solutions with concentrations of 7.81-2000pg/ul were added and incubated for 60 or 120 minutes. Subsequently, secondary antibody and streptavidin-HRP were added as substrate, and the reaction was terminated with stop solution. Absorbance was measured immediately at 450 nm optical densities, and then regression equation was calculated using standard curve.

Result

The light absorbance was insufficient when then dilution of starting concentration for the conjugate antibody was 0.5µg/ml and the light absorbance decreased as the concentration of conjugate antibody reduced. The light absorbance increased when the concentration was 2-4µg/ml, but the standard curve was constructed nonlinear. When standard curve was constructed with 1 µg/ml, the regression equation had R²=0.96, which identifies the optimal concentration. The results were analogous when the incubation times were 60 and 120 minutes with the concentration of 4µg/ml.

Conclusion

The optimal condition for determining IL-2 cytokine was when ELISA conjugate concentration was 1µg/ml (sample and conjugate) and incubation time was 120 minutes, and the regression equation from the standard curve was $y=0.0013x+0.1901$, R²=0.96.

Keywords: cytokine, Interleukin-2, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay

Pp. 13-17, Tables 2, Figures 2, References 15

Үндэслэл

Орчин үеийн суурь судалгаа, тухайлбал, эсийн болон молекул биологи, уургийн судалгаа түүнчлэн аливаа эмгэгийн эмгэг жамын загвар гарган авах, эмнэл зүй, молекул-эпидемиологийн судалгаанд цитокин, түүний уусамтгай рецепторыг тодорхойлох судалгаа нэлээд ач холбогдолтой байна [1]. Мөн аливаа халдварын оношлогоонд үүсгэгчийг тодорхойлох, тэдгээрийн эсрэг үүсэх эсрэгбиеийн хэмжээг тогтоох зорилгоор фермент холбоот эсрэгбиеийн урвалын цомог (ФХЭБУ) оношлуурыг өргөн ашиглаж байна [2]. Манай орны нөхцөлд судалгаа, шинжилгээ, оношилгооны зориулалтаар эдгээр цомгийг үйлдвэрлэн ашиглах нь эдийн засаг, цаг хугацааны хувьд асар их ач холбогдолтой байна.

Зорилго

Биологийн шингэнд агуулагдах IL-2 цикотин тодорхойлох фермент холбоот эсрэгбиеийн оношлуур бүхий цомог гарган авах

Зорилт:

1. IL-2 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын оношлуурын бэхлэгч эсрэгбиеийн концентрацийг тодорхойлох
2. IL-2 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын оношлуурын стандарт муруйг байгуулах
3. IL-2 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын оношлуурын мэдрэг чанарын хязгаарыг тогтоох

Материал, аргазүй

Бид судалгаанд АНУ-ын R&D systems компаний ФХЭБУ-ын цомгийн бүрэлдэхүүн хэсгүүдийг ашигласан. ФХЭБУ-ын бэхлэгч эсрэгбиеийн гарааны хэмжээг тодорхойлохдоо хүний IL-2 эсрэг холбогдох моноклон эсрэгбиеийг ашиглан полистерин урвалын самбарын үүрт 0.5-4µg/ml бүхий концентрациар шингэрүүлж рН 7.2-7.4 бэхлэгч уусмалд 12 цаг инкубаци хийн бэхэлсэн. Дараагаар нь 1%-ийн BSA (үхрийн ийлдэсийн альбумин) бүхий PBS хориглогч уусмалаар тасалгааны температурт урвалын самбарыг 1 цаг саатуулсан. Урвалын самбарыг угаасны дараа стандарт уусмалыг 7,81-2000pg/ml хүртэл шингэрүүлж урвалын самбарын үүр тус бүрт 100мкл хийж тасалгааны хэмд 60 болон 120 минутад инкубаци хийсэн. Урвалын самбарыг угааж бэхлэгч эсрэгбиеийг 37.5 болон 75нг/мл шингэрүүлэлтээр 100мкл-ээр нэмж тасалгааны

хэмд инкубаци хийсэн. Мөн урвалын самбарыг угаан стрептавидин-HRP 40 дахин шингэлж урвалын самбарын үүр тус бүрт 100мкл-ийг хэмж 20 мин инкубаци хийсэн. Дараагаар нь угааж субстрат уусмалаас урвалын самбарын үүр тус бүрт 100мкл нэмж 20 минут инкубаци хийсэн. 50мкл зогсоогч уусмал нэмсэн даруйд 450нм-ийн долгионы уртад гэрлийн шингээлтийг хэмжин стандарт муруйг байгуулан регрессийн тэгшитгэлийг тооцсон.

Үр дүн

ФХЭБУ-ын оношлуурын бэхлэгч эсрэгбиеийн гарааны хэмжээг 0,5µg/ml концентрациар шингэрүүлж стандарт болон хоёрдогч эсрэгбиеийн инкубацийн хугацааг 60 минут туршин регрессийн анализ хийхэд $R^2=0.9929$ байгаа хэдий ч гэрлийн шингээлтийн утга хангалтгүй буюу бэхлэгч эсрэгбиеийн концентраци буурах тусам гэрлийн шингээлтийн утга буурч байсан (Зураг 1). Харин 2µg/ml болон 4µg/ml гэрлийн шингээлтийн утга өссөн болох нь ажиглагдаж байгаа боловч $R^2=0.85$, $R^2=0.84$ буюу стандарт муруй шугаман бус утга илэрхийлэгдэж байна. (Зураг 2) Харин бэхлэгч эсрэгбиеийн хэмжээ 1µg/ml инкубацийн хугацааг 60 минут туршсан үр дүнгээс үзхэд стандарт муруйн регресс тэгшитгэл $R^2=0.96$ байгаа нь хамгийн боломжит утгийг илэрхийлж байна (Хүснэгт 1). Бэхлэгч эсрэгбиеийг 2µg/ml ($R^2=0.85$) 60 минут болон 4 µg/ml ($R^2=0.84$) 120 минут (Зураг 2) инкубаци хийсэн үр дүн ойролцоо утгатай байна (Хүснэгт 2).

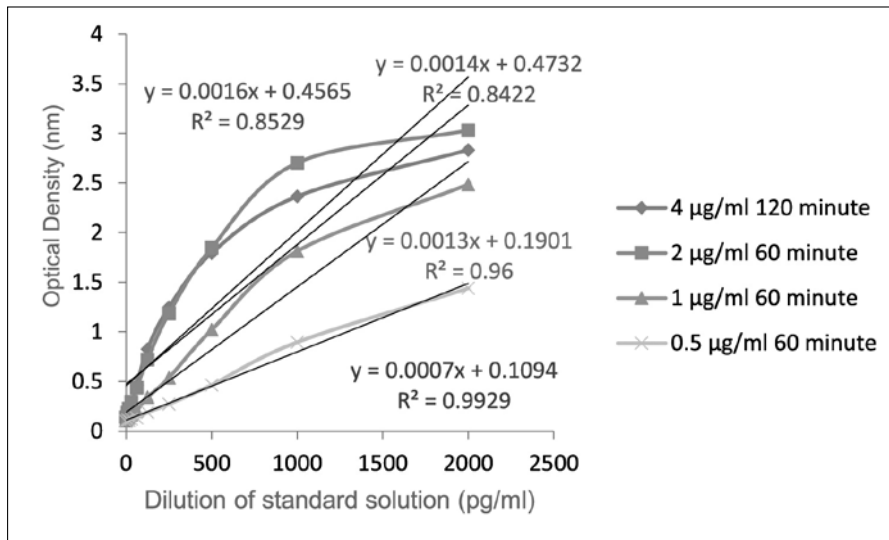


Figure 1. Result of the dilution of capture antibody between 0.5-4 µg/ml (detection antibody 75µg/ml), Dilution of standard solution 7.81-2000pg/ml

Бэхлэгч эсрэгбиеийг 1нг/мкл концентрацид үнэмшилт утга R2=0.96 хамгийн тохиромжтой 60 минут инкубаци хийхэд тэгшитгэлийн шингэрүүлэлтийн утга болохыг тодорхойллоо.

Table1. Capture antibody concentration (0.5-4µg/ml)

Pg/ml	4 ug/ml Standard 120 minute	2 ug/ml standard 60 minute	1 ug/ml standard 60 minute	0.5 ug/ml standard 60 minute
2000	2.834	3.032	2.486	1.44
1000	2.365	2.703	1.813	0.896
500	1.795	1.847	1.021	0.465
250	1.247	1.184	0.537	0.272
125	0.828	0.722	0.341	0.189
62.5	0.465	0.437	0.206	0.133
31.25	0.289	0.295	0.166	0.122
15.6	0.228	0.228	0.141	0.111
7.81	0.167	0.186	0.124	0.117
0	0.128	0.141	0.107	0.102

IL-2 бэхлэгч эсрэгбиеийг 3нг/мкл болон 4нг/мл концентрациар шингэрүүлэн стандарт муруй байгуулахад 3нг/мл стандарт уусмалын регресс тэгшитгэлийн үнэмшилт утга R2=0.79

байсал бол 4нг/мл R2=0.81 байна. Бэхлэгч эсрэгбиеийн концентраци нэмэгдэхэд илрүүлэх дээд хязгаарын (Upper limit detection) хэмжээг нэмэгдүүлж чадахгүй байна.

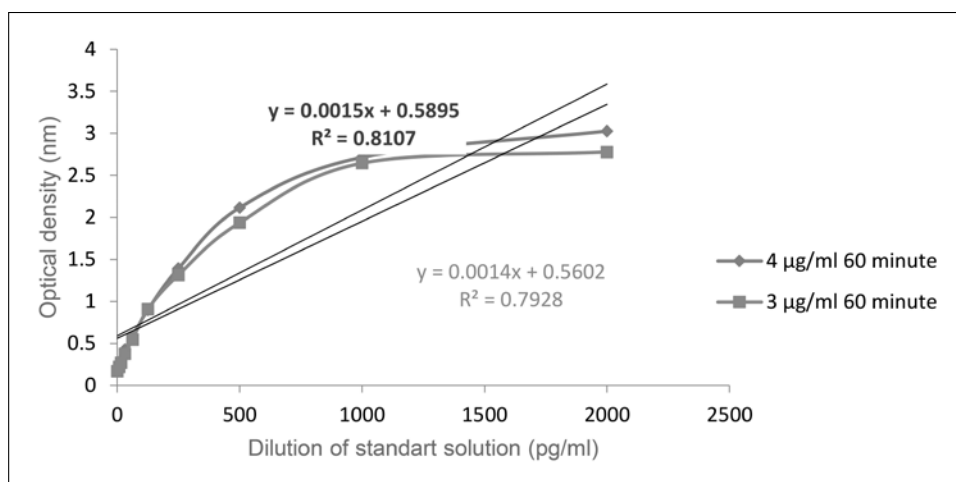


Figure 2. Result of the dilution of capture antibody between 3 -4µg/ml (detection antibody 75µg/ml), Dilution of standard solution 7.81-2000pg/ml

Table 2. Capture antibody concentration (3-4 µg/ml)

Pg/ml	4 ug/ml standard 60 minute	3 ug/ml standard 60 minute
2000	3.027	2.778
1000	2.715	2.646
500	2.115	1.936
250	1.392	1.315
125	0.899	0.908
62.5	0.582	0.544
31.25	0.428	0.377
15.6	0.305	0.268
7.81	0.245	0.221
0	0.168	0.169

Бэхлэгч эсрэгбиеийг 3нг/мл болон 4нг/мл концентрациар шингэлэхэд тэгшитгэлийн үнэмшлийн утга $R^2=0.79$, $R^2=0.81$ тус тус тодорхойлогдлоо. Дээрх нөхцөлд стандарт муруй шугаман бус байна.

Хэлцэмж

ФХЭБУ-ын шинжилгээнд хэрэглэгддэг уураг, эсрэгбие, бусад урвалжийг үйлдвэрлэдэг компаниуд олон байдаг бөгөөд зарим эмбиобэлдмэлийн үйлдвэрүүд нь эдгээрийг нэгтгэн зүйж, оношлуурын цомгийг үйлдвэрлэн нийлүүлдэг. Энэхүү ФХЭБУ-ын цомгийн бүрдэл хэсгүүдийг бага өртгөөр худалдан авч өөрийн оронд цомгийн бүрдэл хэсгүүдийн ажиллах нөхцлийг тодорхойлон бүрдэл хэсгүүдийг нэгтгэн угсарч ФХЭБУ-ын цомгийг бий болгосноор судалгаа шинжилгээ, оношлогоонд ашиглах бүрэн боломжтой юм. Бид энэхүү цомгийн бэхлэгч эсрэгбиеийн тохиромжтой концентрацийг тодорхойлохдоо 0,5-4нг/мл-ээр

шингэлж, инкубацийн хугацааг 60-120 минутын хооронд туршсан. Fatema K., Tabassum S нарын гепатит С вирусийн гадаргуугийн антигенийг тодохойлох in house ФХЭБУ-ыг хөгжүүлэх судалгааны үр дүнгээс харахад бэхлэгч эсрэгбиеийн концентрацийг 1.25-10 µg/ml хооронд буюу 10нг/мл, 5нг/мл, 2.5нг/мл, 1.25нг/мл концентрациар шингэлж 1,25нг/мл тохиромжтой хэмээн дүгнэж судалгаанд нийтэлсэн байна. Fatema K., Tabassum S. (2010) нарын судалгаанд бэхлэгч эсрэгбиеийн тохиромжтой хэмжээг 1,25нг/мл [3] тогтоосон бол бидний IL-2 ФХЭБУ-н бэхлэгч эсрэгбиеийн тохиромжтой хэмжээ 1нг/мл концентрацид стандарт муруйн үнэмжлийн утга $R^2=0.96$ буюу хамгийн өндөр утгатай байна. Мөн Р.Энхтуяа, Д.Лхагвасүрэн (2010) нар AFP-ны ФХЭБУ-д суурилсан in house элэгний хавдрын оношилох цомог оношлуур бүтээх судалгааны үр дүнгээс харахад бэхлэгч эсрэгбиеийг 4нг/мл концентрациар шингэлэхэд $R^2=0.97$ байна

[4]. Бидний судалгаанд хэрэглэсэн ажлын уусмалын (стандарт уусмал болон хоёрдогч эсрэгбие, субстрат уусмал) эзэлхүүн дээрх судалгаануудтай ижил хэмжээтэйгээр хэргэлсэн. Цаашид энэхүү цомог оношлуурын бүртгэх (detection limit) хязгаарыг нэмэгдүүлснээр судалгаа шинжилгээнд өргөн хэрэглэж худалдаанд гаргах бүрэн бололцоотой юм.

Дүгнэлт:

1. IL-2 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын бэхлэгч эсрэгбиеийн хэмжээ 1µg/ml-д (сорьц болон бэхлэгч эсрэгбиеийн) инкубацийн хугацаа 60 минутанд стандарт муруйн регресс тэгшитгэл $y=0.0013x+0.1901$, $R^2=0.96$ байгаа нь тохиромжтой нөхцөл болохыг тодорхойллоо.
2. IL-2 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын стандарт муруйн регресс тэгшитгэл $y=0.0013x+0.1901$, $R^2=0.96$ хамгийн тохиромжтой нөхцөл болохыг тогтоосон нь худалдааны цомогтой ойролцоо байна.
3. Судалгааны явцад боловсруулсан IL-2 тодорхойлох ФХЭБУ-н бүртгэх доод хэмжээ буюу (Lower limit detection-LLD) 15.6pg/ml байсан бол бүртгэх дээд хэмжээ (upper limit detection-ULD) 2000 pg/ml байна.

Түлхүүр үг. Фермент холбоот эсрэгбиеийн урвал (ELISA), цитокин, интерлейкин-2

Ном зүй

1. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storms in infectious diseases. Seminars in immunopathology July 2017, Volume 39, Issue 5, p. 501-503
2. Yoshihara N. Nihon Rinsho. ELISA for diagnosis of infections by viruses. Nihon Rinsho. 1995 Sep;53(9):2277-82. Review. Japanese
3. Fatema K, Tabassum S, Nessa A, Jahan M. Development and evaluation of an in-house ELISA to detect hepatitis B virus surface antigen in resource-limited settings. Bangladesh Med Res Counc Bull 2013; 39: 65-68
4. Radnaa Enhktuya, Damdindorj Lkhagvasuren. Possibility of In-House Preparation of Liver Cancer Diagnostic Kits Based on AFP ELISA Test. Mongolian Journal of Biological Sciences 2010 Vol. 8(2): 43-48
5. Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. 1971(Immunochemistry):v8 p871-875.

6. Yalow RS BS. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. Clin Invest. 1960;39:1157-1175
7. S A. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Immunochemistr. 1969:6:43-52.
8. Kϕhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. J Immunol. 2005 Mar 1;174(5):2453-5
9. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. J Cell Biol (1967).v33 p307318
10. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. FEBS Letts 1971:15:232-236.
11. Rachel Ferreira, Leila Fonseca, Walter Lilenbaum. Comparison between a commercial and an in-house ELISA for anti-M. avium paratuberculosis antibodies detection in dairy herds in Rio de Janeiro, Brazil. Rev Latinoam Microbiol Vol. 44, No. 3-4 July - December. 2002 pp. 129-132
12. Kei Ohnuma, Tatsuhiko Saito, Ryou Hatano, Osamu Hosono, Satoshi Iwata. Comparison of Two Commercial ELISAs against an In-House ELISA for Measuring Soluble CD26 in Human Serum. Journal of Clinical Laboratory Analysis 00: 1-6 (2014)
13. Silvia A. Longhi, Silvia B. Brandariz, Sonia O. Lafon, Leticia L. Niborski. Short Report: Evaluation of In-House ELISA Using Trypanosoma cruzi Lysate and Recombinant Antigens for Diagnosis of Chagas Disease and Discrimination of Its Clinical Forms. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 87(2), 2012, pp. 267-271
14. Liao W LJ, Leonard WJ. L-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation". Current Opinion in Immunology. October 2011:23 (25): 598-604.
15. Malek TR CI. "Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity". Immunity. August 2010: (2): 153-165.

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Биологийн шинжлэх ухааны доктор,
дэд профессор Ж.Оюунбилэг*