

Новый подход к определению коэкспрессии антигенов клеток при проведении анализа с использованием иммунологического биочипа

А.В. Шишкин¹, Н.Г. Овчинина¹, С.С. Бессмельцев²

¹ГОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия;

²ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

Контакты: Александр Валентинович Шишкин Shishkin_lab@mail.ru

В данной работе предложен новый подход, позволяющий определять большое число вариантов коэкспрессии антигенов клеток при проведении анализа с использованием иммунологического биочипа. Рассматривается новая конструкция тест-системы для исследования клеток, содержащей биочип с тестовыми участками, выполненными в виде линий, а также специальное приспособление для проведения анализа. Приводятся примеры исследования клеток. При этом осуществляется сравнение полученных результатов с результатами исследования, выполненного с использованием биочипов ранее известной конструкции.

Ключевые слова: иммунологический биочип, определение поверхностных антигенов клеток, определение коэкспрессии антигенов

Novel approach for detection of cell antigen coexpression using immunological biochip

A. V. Shishkin¹, N. G. Ovchinina¹, S. S. Bessmeltsev²

¹Izhevsk State Medical Academy; ²Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg

New approach for detection of large number of different variants of cell antigen coexpression using the immunological biochip is suggested in this work. Novel construction of immunological biochip for cell investigation with test zones as strips and new special device for incubation are considered. Examples of cell analysis are given. Results are compared with data of investigation where previously known patterns of biochips were used.

Key words: immunological biochips, cell surface antigens, coexpression

Введение

Весьма перспективным направлением иммунодиагностики является исследование антигенов клеток с использованием иммунологических биочипов. Данный подход был реализован в ряде зарубежных и отечественных работ [1–12]. Биочипы, описанные в большинстве этих работ, имели сходную конструкцию (рис. 1). Они представляли собой подложки, на которых в строго определенных тестовых участках («пятнах») были иммобилизованы антитела, специфичные к поверхностным антигенам клеток. Отличия заключались главным образом в количестве тестовых участков и специфичности иммобилизованных антител, а также в использовании подложек из разных материалов.

Анализ основан на связывании клеток, имеющих определяемые антигены, в области участков биочипа, содержащих иммобилизованные антитела, специфичные к данным антигенам. Методика проведения анализа включает инкубацию биочипа с клеточной суспензией, отмывку биочипа от не связавшихся с антителами клеток, считывание результата и определение плотности связывания клеток в области пятен биочипа. Исходя из величины плотности

связывания клеток в области каждого из пятен биочипа, может быть выполнена оценка содержания в исследуемом образце клеток, имеющих соответствующие антигены.

С помощью биочипа подобной конструкции можно определить множество различных поверхностных антигенов на разных клетках. Но на одной отдельно взятой клетке по факту ее связывания в том или ином пятне с иммобилизованными антителами может быть определен только один антиген. В то же время во многих случаях очень важна информация о наличии или отсутствии на каждой отдельно взятой клетке несколь-

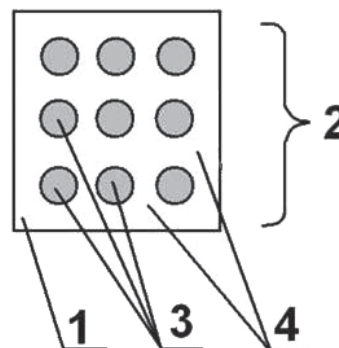


Рис. 1. Устройство биочипа 1-го типа, использованного в данной работе: 1 — подложка; 2 — рабочая область биочипа; 3 — тестовые участки (пятна) с иммобилизованными антителами; 4 — фоновые участки подложки, не содержащие иммобилизованных антител

ких антигенов. В некоторых работах зарубежных авторов [2, 7, 10], а также в ранее проведенных собственных исследованиях [12] данная задача решалась за счет дополнительной обработки клеток антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой. При этом на отдельно взятой клетке один антиген определялся по факту связывания клетки в том или ином пятне биочипа, а второй антиген определялся по окрашиванию клетки флуоресцентной меткой. Таким образом, для определения на отдельно взятой клетке двух антигенов достаточно было использовать меченые антитела одного типа. На подложке биочипа было иммобилизовано много видов антител с различной специфичностью. Поэтому при дополнительной обработке мечеными антителами, специфичными к одному антигену, на разных клетках определялась коэкспрессия этого антигена в паре с другими антигенами, определяемыми с помощью биочипа. Обработка биочипа со связанными клетками смесью нескольких антител, имеющих различную специфичность и меченных разными метками, позволила бы определять большее число вариантов коэкспрессии антигенов.

Вместе с тем такой подход имеет ряд серьезных недостатков. Во-первых, количество определяемых вариантов коэкспрессии недостаточно велико. Во-вторых, в контакт с раствором меченых антител необходимо приводить всю поверхность биочипа, которая содержит не только участки с иммобилизованными антителами, но и фоновые участки, не содержащие иммобилизованных антител. Этим обусловлен высокий расход дорогостоящих меченых антител. В результате, определение коэкспрессии антигенов значительно повышает стоимость проведения анализа.

Задачей данной работы является достижение возможности одновременного определения большого количества вариантов коэкспрессии антигенов при меньшем расходе меченых антител во время проведения анализа с использованием иммунологического биочипа.

Материалы и методы

В процессе проведения данной работы использовались биочипы 2 типов.

1. Биочипы базовой конструкции (рис. 1), аналогичные биочипам, использованным в наших предыдущих исследованиях [11, 12].

2. Биочипы, предназначенные для одновременного определения большого количества вариантов коэкспрессии антигенов. Данные биочипы использовались в комбинации со специальным устройством.

Проведение исследований с использованием биочипов 1-го типа

Конструкция биочипа 1-го типа

Биочип 1-го типа (рис. 1) представляет собой твердую подложку, на которой в строго определен-

ных местах (тестовых участках, «пятнах») иммобилизованы молекулы антител. В каждом из тестовых участков иммобилизованы антитела, специфичные к одному поверхностному антигену клеток. Но разные тестовые участки отличаются друг от друга специфичностью иммобилизованных в них антител. Тестовые участки отделены друг от друга фоновыми участками, не содержащими иммобилизованных антител.

В данном случае для изготовления биочипов были использованы прозрачные пластиковые подложки. В тестовых участках подложки были адсорбированы мышинные моноклональные антитела (IgG), специфичные к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов человека: CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD20, CD23, CD45 (АО «Сорбент ЛТД», Россия). Размеры подложки составляли 8 × 8 мм.

Необходимо отметить, что в своих предыдущих исследованиях [11, 12] мы применяли биочипы аналогичной конструкции, содержащие значительно большее число видов иммобилизованных антител.

Изготовление биочипов 1-го типа

При изготовлении биочипов 1-го типа капли растворов антител объемом 0,25 мкл наносили на подложки в заранее отмеченные участки. Далее подложки помещали в камеру со 100 % влажностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего высушивали на воздухе и замораживали при -26°C в герметичных контейнерах. При таком хранении биочипы не теряли своих свойств по меньшей мере в течение 12 месяцев.

Получение клеточной суспензии

Лейкоциты были выделены из периферической крови путем центрифугирования в растворе фиколла и урографина с плотностью 1,077 г/мл и трижды отмыты PBS. Полученные клетки ресуспензировали в растворе, содержащем 20 % (по объему) инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и 1,5мМ ЭДТА в PBS.

Проведение анализа с использованием биочипа 1-го типа

После разморозки биочип закрепляли в кювете, ополаскивали 1 % раствором BSA в буфере PBS, затем проводили 3-кратную отмывку 0,05 % раствором детергента Tween-20 на шейкере. После этого биочип инкубировали с 1 % раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании на шейкере. Затем вновь проводили 3-кратную отмывку 0,05 % раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента.

В кювету с биочипом вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 минут без какого-либо перемешивания. Концентрация клеток

и объем суспензии подбирались таким образом, чтобы при оседании клеток происходило полное покрытие ими поверхности биочипа. После завершения инкубации для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами, биочипы несколько раз ополаскивали PBS. Качество отмывки оценивали при помощи стереомикроскопа МБС-1. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител. Далее в течение 12 минут осуществляли фиксацию связанных клеток метанолом, после чего биочип высушивали на воздухе.

Затем биочип осторожно отделяли от дна кюветы и размещали его на предметном стекле. Каждое пятно биочипа фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата через микроскоп на малом увеличении. В каждом из пятен биочипа определяли плотность связывания клеток (отношение количества клеток, к площади поверхности участка, на котором они связаны). Для этого на микрофотографии каждого пятна выбирали участки, соответствующие участку подложки размерами 100×100 мкм и проводили определение количества связанных клеток не менее чем в 3–4 таких участках. Полученные значения усредняли.

Для удобства использования полученных результатов значения плотности заполнения поверхности пятен связавшимися клетками выражали в процентах. За 100 % принималась средняя плотность связывания клеток в области пятен с антителами анти-CD45. Исходя из этого осуществлялся пересчет в проценты плотности связывания клеток в области других пятен. Ранее было показано [11, 12], что при проведении инкубации биочипа с клеточной суспензией без перемешивания получаемые значения плотности связывания клеток в области тестовых участков биочипа оказываются пропорциональны фактическому содержанию в исследуемом образце клеток, имеющих соответствующие антигены. При этом плотность связывания клеток в пятне биочипа, выраженная в процентах, численно совпадает с процентным содержанием в исследуемом образце клеток, имеющих определяемый антиген.

Проведение исследований с использованием биочипов 2-го типа

Устройство биочипа 2-го типа

Биочип был изготовлен на подложке из прозрачного пластика размерами 22×22 мм. На подложке биочипа были иммобилизованы мышиные моноклональные антитела (IgG), специфичные к антигенам CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD23, CD45 (АО «Сорбент ЛТД», Россия). Иммобилизация антител осуществлялась за счет адсорбции. Тестовые участки биочипа были нанесены на подложку в виде параллельных полос (рис. 2).

Приспособление, предназначенное для проведения анализа с использованием биочипа 2-го типа

Для проведения анализа с использованием данного биочипа было разработано специальное приспособление, конструкция которого представлена на рис. 3.

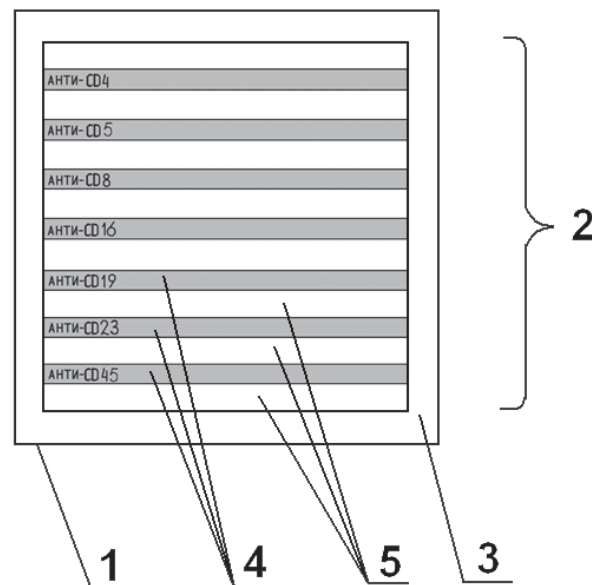


Рис. 2. Схема биочипа 2-го типа, использованного при проведении данного исследования. Указана специфичность антител, иммобилизованных в тестовых участках: 1 — подложка; 2 — рабочая область; 3 — край подложки; 4 — тестовые участки с иммобилизованными антителами, нанесенные в виде полос; 5 — фоновые участки, не содержащие иммобилизованных антител

Приспособление имеет корпус, представляющий собой пластину, в которой выполнено отверстие, соответствующее форме и размерам биочипа. К корпусу крепится съемное дно, выполненное из прозрачного материала и имеющее прозрачное клейкое покрытие. При креплении дна к корпусу образуется емкость, форма и размеры горизонтального сечения которой соответствуют форме и размерам биочипа. К съемному дну крепится биочип за счет приклеивания к клейкому покрытию. Жесткость фиксации съемного дна к корпусу обеспечивает прижимающая рама.

Приспособление снабжено съемной рамкой, представляющей собой пластину, в которой выполнены сквозные отверстия (прорези) вытянутой формы, расположенные параллельно друг другу. Рамка устанавливается на поверхность биочипа. Она разделяет емкость, в которой размещен биочип, на несколько каналов, имеющих меньшие размеры. При этом прорези имеют на концах расширения, предназначенные для введения растворов меченых антител с помощью шприца Гамильтона. Рамка устанавливается таким образом, что ее прорези располагаются перпендикулярно тестовым участкам биочипа. При этом каждый канал пересекает все тестовые участки

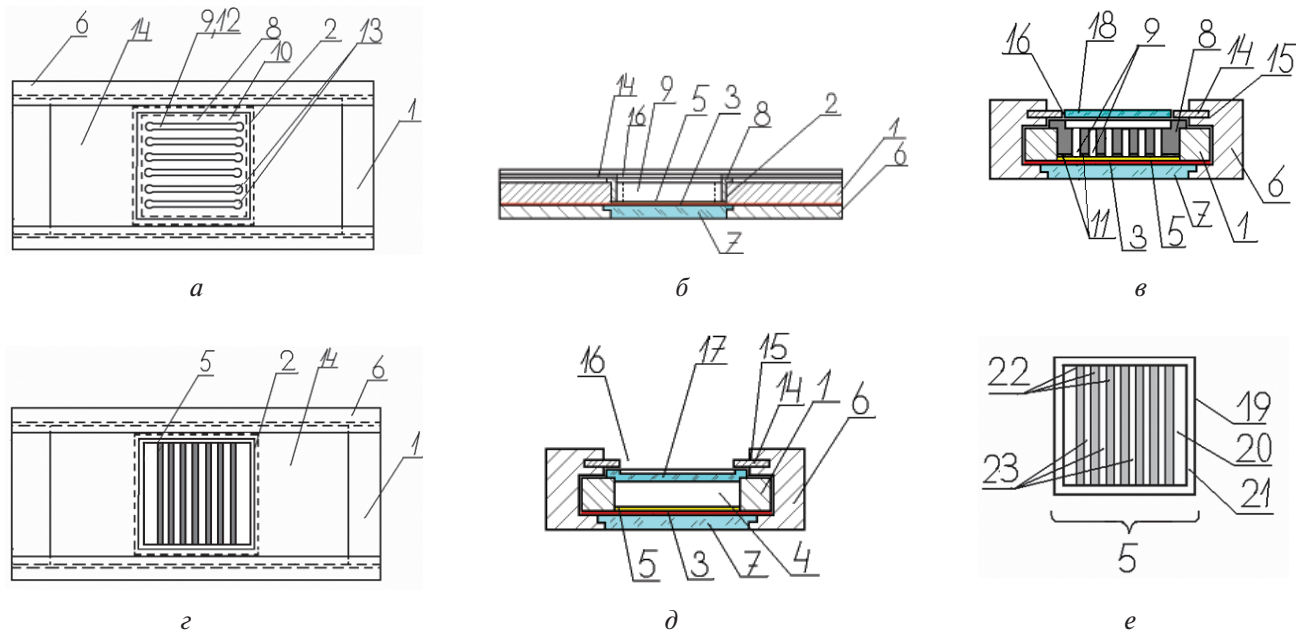


Рис. 3. Конструкция приспособления для проведения анализа с использованием биочипа 2-го типа: а — общий вид устройства сверху с установленной рамкой; б — продольный разрез устройства с установленной рамкой; в — поперечный разрез с установленной рамкой; г — вид устройства сверху с установленными биочипом и съемной прозрачной крышкой и снятой рамкой; д — поперечный разрез устройства с установленными биочипом и съемной прозрачной крышкой и снятой рамкой; е — биочип; 1 — корпус; 2 — отверстие, соответствующее размерам биочипа; 3 — съемное дно; 4 — емкость для размещения биочипа; 5 — биочип; 6 — прижимающая рама; 7 — прозрачная вставка; 8 — съемная рамка; 9 — каналы; 10 — корпус съемной рамки (8); 11 — герметизирующее покрытие; 12 — прорезы съемной рамки (8); 13 — расширения прорезей (12) съемной рамки (8); 14 — прижимающая пластина; 15 — пазы для крепления прижимающей пластины; 16 — отверстие прижимающей пластины; 17 — съемная крышка I; 18 — съемная крышка II; 19 — подложка биочипа; 20 — рабочая область биочипа; 21 — края биочипа; 22 — тестовые участки биочипа; 23 — фоновые участки биочипа

(полосы) биочипа. Таким образом, на дне каждого канала располагаются фрагменты всех тестовых участков.

Рамка фиксируется к поверхности биочипа с помощью прижимающей пластины, которая подвижно крепится в пазах, выполненных в прижимающей раме.

Приспособление снабжено двумя съемными крышками, предназначенными для уменьшения испарения воды. Крышки несколько отличаются друг от друга по форме. Одна из них используется при установленной рамке с прорезями, а вторая — при снятой рамке.

Проведение анализа с использованием биочипа 2-го типа

Биочип закрепляли в емкости приспособления, ополаскивали 1 % раствором BSA в буфере PBS, затем проводили 3-кратную отмывку 0,05 % раствором детергента Tween-20 на шейкере. После этого биочип инкубировали с 1 % раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании на шейкере. Затем вновь проводили 3-кратную отмывку 0,05 % раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента. В емкость приспособления вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 минут без какого-либо перемешивания. Подготовка исследуемой клеточной суспензии осуществлялась точно так же, как и при работе с биочипами 1-го ти-

па. Концентрация клеток и объем суспензии подбирались так, чтобы при оседании клеток происходило максимальное заполнение ими поверхности биочипа. После завершения инкубации для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами, биочип несколько раз ополаскивали PBS. Для этого емкость приспособления заполняли буфером, который сразу же сливали. Качество отмывки оценивали при помощи стереомикроскопа МБС-1. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител. Затем биочип в течение 10 минут инкубировали с питательной средой RPMI-1640. Это повышало прочность связывания с подложкой клеток, оставшихся связанными с поверхностью биочипа после проведения отмывки. Затем проводили 3-кратное ополаскивание биочипа PBS. Биочип обрабатывали 1 % раствором параформальдегида в PBS, а затем трижды ополаскивали PBS. Буферный раствор сливали, а его капли аккуратно удаляли со стенок емкости фильтровальной бумагой.

На поверхность биочипа устанавливали съемную рамку таким образом, чтобы ее сквозные прорезы располагались поперек тестовых участков биочипа. В результате каждый из образующихся каналов перекрывал все тестовые участки биочипа. С помощью шприца Гамильтона в каналы вносили растворы флуоресцентно меченых антител. При этом находящиеся

в разных каналах растворы антител не могли смешиваться друг с другом. Были использованы антитела, специфичные к антигенам CD3, CD5, CD16, CD19, CD20, CD45 (АО «Сорбент ЛТД», Россия). Антитела каждого вида были конъюгированы с FITC. Инкубация с растворами антител осуществлялась в течение 60 минут. При этом для предотвращения испарения воды из каналов устройство помещали в атмосферу с повышенной влажностью воздуха или устанавливали крышку на рамку с прорезями. После завершения инкубации удаляли жидкость из каналов, прикладывая к рамке с прорезями фильтровальную бумагу, сложенную в несколько слоев. Далее биочип ополаскивали 1 % раствором BSA в PBS, а затем еще дважды ополаскивали только PBS. Рамку и бортик снимали. На поверхность биочипа наносили каплю жидкости, накрывали биочип покровным стеклом и проводили исследование его поверхности с помощью люминесцентного микроскопа. С помощью установленной на микроскопе цифровой фотокамеры выполняли фотографирование тех участков его поверхности, где пересекались тестовые участки и каналы. При наличии коэкспрессии в местах пересечения отмечалась флуоресценция связанных с биочипом клеток (рис. 4).

При изучении микрофотографий, выполненных при обычном и ультрафиолетовом освещении, определяли общее количество клеток, связанных на участках определенной площади (плотность связывания клеток), а также количество флуоресцирующих клеток на тех же участках. Определение общего числа клеток и флуоресцирующих клеток осуществляли не менее чем в 3–4 участках (площадью 10 000 мкм² каждый) в области каждого пересечения тестового участка и канала. Полученные значения усредняли. Для более удобной обработки и интерпретации результатов полученные значения выражали в процентах. При этом за 100 % принималась средняя общая плотность связывания клеток в области тестового участка с антителами, специфичными к антигену CD45, который присутствует на поверхности всех типов лейкоцитов.

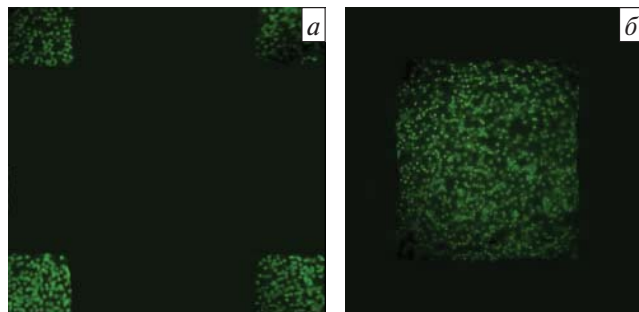


Рис. 4. Микрофотографии поверхности биочипа в области пересечения тестовых участков и каналов, в которые в процессе анализа вносили растворы FITC-меченых антител. Рамка приспособления снята. Микрофотографии выполнены при ультрафиолетовом освещении: а — увеличение в 50 раз; б — увеличение в 100 раз

Ранее было показано [12], что выраженные в процентах значения плотности связывания клеток в области тестовых участков биочипов численно практически равны фактическому процентному содержанию в образце клеток, имеющих соответствующие антигены. Поэтому полученные значения интерпретировали как содержание клеток.

Проведение контрольного исследования методом проточной цитофлуориметрии

Для проверки результатов исследования, выполненного с использованием биочипов 1-го и 2-го типов, был проведен дополнительный анализ с использованием проточной цитофлуориметрии. Данное исследование выполнялось на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием антител, специфичных к антигенам CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD20, CD23, CD45 (Daco, США).

Результаты

С помощью разработанного приспособления и биочипов 2-го типа были исследованы клетки здорового человека и клетки больной Ф. 52 лет, страдающей хроническим В-клеточным лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ).

Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2, где указано содержание клеток, имеющих поверхностные антигены, определяемые по связыванию с биочипом, а также содержание клеток, окрашившихся мечеными антителами с указанной специфичностью.

Таким образом, на клетках здорового человека определялась коэкспрессия антигенов CD3/CD4, CD3/CD5, CD3/CD8, CD4/CD5, CD5/CD8, CD19/CD20, CD3/CD45, CD4/CD45, CD5/CD45, CD8/CD45, CD16/CD45, CD19/CD45, CD20/CD45, что соответствует норме. CD23⁺ клетки не были обнаружены, что также является нормой.

При исследовании клеток больной, страдающей В-ХЛЛ, определялись все вышеуказанные варианты коэкспрессии. Но содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ клеток было значительно меньше, чем у здорового человека. Вместе с тем было велико содержание CD19⁺, CD20⁺ и CD23⁺ клеток. При этом большинство из них коэкспрессировало антиген CD5⁺. Наличие коэкспрессии CD5/CD19, CD5/CD23, CD19/CD23 характерно для клеток В-ХЛЛ.

Необходимо отметить, что на подложке биочипа были иммобилизованы антитела, специфичные к антигенам CD5, CD16, CD19, специфичные к этим же антигенам флуоресцентно меченые антитела также вносились в каналы устройства. Это было необходимо для того, чтобы проверить возможное наличие перекрестной реактивности антител. В данном случае перекрестная реактивность не была обнаружена.

Таблица 1. Результат исследования клеток здорового человека с помощью биочипа 2-го типа

Тестовые участки биочипа		№ прорези рамки					
		1	2	3	4	5	6
Дополнительно добавленные меченые антитела							
№	Иммуни- зованные антитела	Анти-CD3 FITC	Анти-CD5 FITC	Анти-CD16 FITC	Анти-CD19 FITC	Анти-CD20 FITC	Анти-CD45 FITC
1	Анти-CD4	65 ± 7/65 ± 7	67 ± 5/67 ± 5	63 ± 7/0	65 ± 5/0	62 ± 5/0	68 ± 6/68 ± 6
2	Анти-CD5	74 ± 6/70 ± 3	72 ± 5/72 ± 5	70 ± 7/0	73 ± 5/0	76 ± 5/0	71 ± 5/71 ± 5
3	Анти-CD8	28 ± 5/28 ± 5	30 ± 6/29 ± 6	27 ± 6/0	29 ± 4/0	26 ± 5/0	27 ± 7/27 ± 7
4	Анти-CD16	12 ± 3/0	12 ± 5/0	13 ± 4/13 ± 4	14 ± 4/0	11 ± 4/0	13 ± 5/13 ± 5
5	Анти-CD19	15 ± 4/0	16 ± 5/0	14 ± 5/0	15 ± 6/15 ± 6	14 ± 4/14 ± 4	13 ± 4/13 ± 4
6	Анти-CD23	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7	Анти-CD45	100/73 ± 3	100/76 ± 5	100/13 ± 5	100/16 ± 6	100/15 ± 3	100/100

Примечание (здесь и в табл. 2): выделение цветом — наличие флуоресцирующих клеток; .../... — общее содержание клеток, имеющих антиген (%) / содержание клеток, имеющих флуоресценцию (%). Приводятся ошибки среднего.

Таблица 2. Результат исследования клеток больной В-ХЛЛ с помощью биочипа 2-го типа

Тестовые участки биочипа		№ прорези рамки					
		1	2	3	4	5	6
Дополнительно добавленные меченые антитела							
№	Иммуни- зованные антитела	Анти-CD3 FITC	Анти-CD5 FITC	Анти-CD16 FITC	Анти-CD19 FITC	Анти-CD20 FITC	Анти-CD45 FITC
1	Анти-CD4	10 ± 3/10 ± 3	8 ± 3/7 ± 3	9 ± 4/0	10 ± 4/0	11 ± 4/0	8 ± 4/8 ± 4
2	Анти-CD5	74 ± 4/9 ± 4	75 ± 4/75 ± 4	76 ± 3/0	72 ± 4/60 ± 7	75 ± 5/62 ± 6	71 ± 6/71 ± 6
3	Анти-CD8	10 ± 3/10 ± 3	8 ± 3/8 ± 3	9 ± 3/0	11 ± 4/0	10 ± 4/0	12 ± 4/12 ± 4
4	Анти-CD16	0/0	1,4 ± 1/0	2 ± 1/2 ± 1	1 ± 1/0	0/0	2 ± 1/2 ± 1
5	Анти-CD19	92 ± 6/0	92 ± 7/63 ± 7	90 ± 5/0	91 ± 6/91 ± 6	87 ± 7/83 ± 7	89 ± 5/89 ± 5
6	Анти-CD23	74 ± 6/0	68 ± 7/65 ± 5	70 ± 5/0	72 ± 4/72 ± 4	71 ± 6/71 ± 6	72 ± 3/72 ± 3
7	Анти-CD45	100/10 ± 4	100/76 ± 6	100/2 ± 1	100/88 ± 4	100/87 ± 5	100/100

Результаты определения содержания клеток, имеющих каждый из указанных антигенов, были сопоставлены с данными, полученными при использовании биочипов 1-го типа, и данными, полученными методом проточной цитофлуориметрии (рис. 5, 6).

Результаты, полученные с помощью биочипов обеих конструкций, хорошо соответствовали друг другу. Результаты, полученные с помощью проточной цитофлуориметрии, также были близкими, несмотря на использование антител другого производителя.

При проведении исследования клеток больной В-ХЛЛ методом проточной цитофлуориметрии определялось высокое содержание клеток, имеющих коэкспрессию CD5/CD19 (71 %), CD5/CD23 (70 %) и CD19/CD23 (65 %).

Обсуждение

Представленные результаты демонстрируют возможность определения нескольких вариантов коэкспрессии при использовании антител, конъюгированных с флуорохромной меткой одного и того же типа. В области пересечения каждого канала с тестовым участком биочипа 2-го типа на связанных клетках может быть определено наличие или отсутствие коэкспрессии 2 антигенов при заполнении канала раствором одного вида антител. Каждый канал пересекает все тестовые участки биочипа, поэтому сразу определяется наличие или отсутствие коэкспрессии нескольких пар антигенов.

Возможно заполнение одного и того же канала раствором, содержащим несколько видов антител с разной специфичностью, меченных разными метками. Также могут быть значительно увеличены ко-

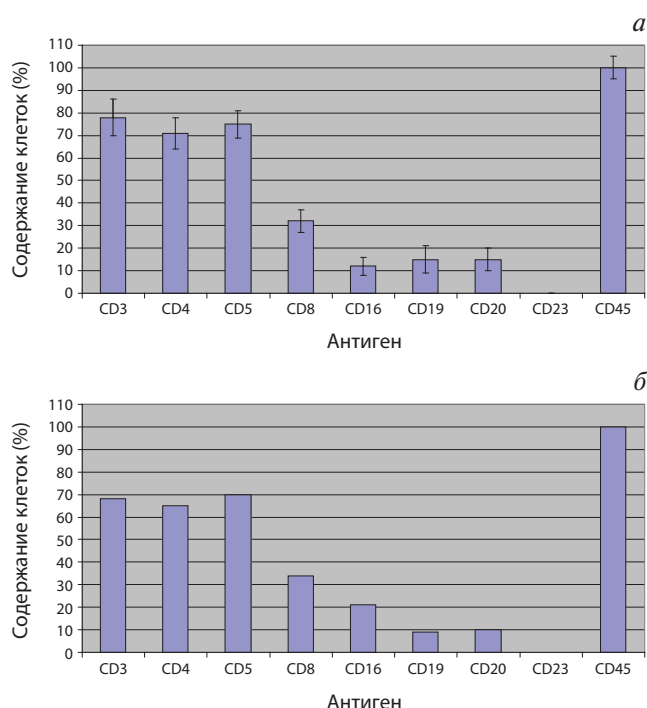


Рис. 5. Результаты исследования клеток здорового человека, полученные: а — при использовании биочипа 1-го типа; б — методом проточной цитофлуориметрии

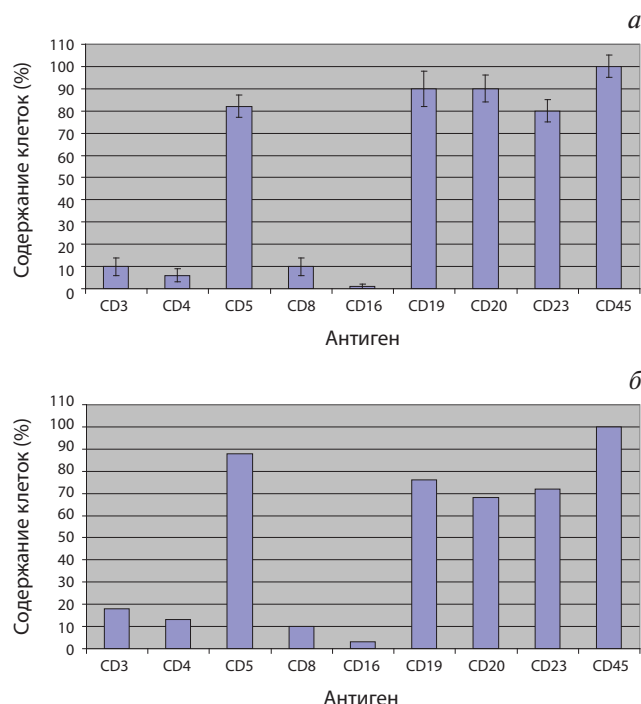


Рис. 6. Результаты исследования клеток больной В-ХЛЛ, полученные: а — при использовании биочипа 1-го типа; б — методом проточной цитофлуориметрии

личество каналов рамки и количество тестовых участков (полос) биочипа 2-го типа. Таким образом, при использовании данного подхода в дальнейшем можно будет одновременно определять наличие или отсутствие коэкспрессии нескольких антигенов на каждой отдельно взятой клетке и десятки или сотни

различных вариантов коэкспрессии антигенов на разных клетках.

При использовании существующего экспериментального образца приспособления в каждый канал требовалось вносить не менее 5 мкл раствора меченых антител. Это достаточно много, но данный объем можно будет значительно уменьшить при изменении конструкции некоторых элементов приспособления. Безусловно, проведение анализа описанным способом является достаточно трудоемким. Но в дальнейшем возможна его полная или частичная автоматизация. Поэтому представленное здесь приспособление, предназначенное для работы с биочипом 2-го типа, необходимо рассматривать как прототип для последующего создания более совершенных конструкций.

Необходимо отметить, что достаточно похожая с технической точки зрения идея используется в технологии, известной как метод микропроточных сетей (microfluidic network — μ FN). Но ее применение сводится к технологии изготовления биочипов и способу приведения их поверхности в контакт с исследуемой жидкостью. О работах, в которых подобный подход использовался бы для определения коэкспрессии антигенов клеток, нам ничего не известно.

Необходимо отметить, что идея определения множества вариантов коэкспрессии антигенов на одном биочипе может быть реализована не только при использовании описанного выше технического решения, когда применяется комбинация биочипа (одноразового использования), представленного на рис. 2, и инкубационно-отмывочного приспособления (многократного использования), представленного на рис. 3. Возможно также применение биочипа (патент на полезную модель RU 92964) одноразового использования, содержащего в своей конструкции все основные элементы описанного выше приспособления. Экономически более оправдано применение одноразового биочипа и многократного инкубационно-отмывочного устройства, которые описаны в этой статье. Но после каждого использования будет необходима стерилизация данного устройства. Поэтому выбор того или иного из вариантов должен быть обусловлен практической целесообразностью и соображениями безопасности при проведении конкретного исследования.

При возможности определения даже несколько большего количества антигенов на разных клетках (по факту связывания клеток в тестовых участках) биочип 1-го типа имел значительно меньшие размеры. Поэтому для проведения исследования требовалось меньшее количество клеточной суспензии. Но использование биочипов 2-го типа давало преимущества, описанные выше. Поэтому выбор конструкции используемых биочипов должен зависеть от условий, необходимых для решения тех или иных диагностических или исследовательских задач.

Описанный способ проведения анализа намного превосходит по своим возможностям общепринятые методы иммунофлуоресцентного исследования клеток [13, 14]. Но по сравнению с проточной цитофлуориметрией он требует большего расхода клеточной суспензии. Кроме того, данный способ будет заведомо проигрывать ей в точности при определении содержания очень малых иммунологических субпопуляций клеток. Поэтому в существующем виде и при использовании описанной методики данная разработка не может быть использована для решения, например, таких задач, как выявление минимальной остаточной болезни или определение концентрации в крови стволовых клеток.

Однако ее применение позволяет проводить анализ без дорогостоящего проточного цитофлуориметра с использованием гораздо более дешевого люминесцентного микроскопа. При этом возможно одновременное определение большого числа вариантов коэкспрессии антигенов при использовании такого же набора меченых антител.

Помимо определения коэкспрессии антигенов подобный подход в дальнейшем может быть использован и для выполнения других типов комбинированных исследований связавшихся клеток, требующих приведения различных участков поверхности биочипа в контакт с малыми объемами растворов различных реагентов или красителей без их смешивания друг с другом. Поэтому дальнейшее развитие данного направления представляется нам перспективным.

Выводы

1. Биочип 2-го типа в сочетании с разработанным приспособлением позволяет проводить определение нескольких вариантов коэкспрессии с использованием антител, конъюгированных с одинаковой флуоресцентной меткой.

2. Результаты анализа, выполненного с применением биочипов 1-го и 2-го типа, сопоставимы друг с другом и результатами проточной цитофлуориметрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chang T.W. Binding of cells of distinct antibodies coated on solid surface. *Journal Of Immunological Methods* 1983;65:217–23.
2. Belov L., de la VEGA O., dos Remedios C.G., Mulligan S.P., Christopherson R.I. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer research* 2001;61:4483–9.
3. Belov L., Huang P., Barber N., Mulligan S.P., Christopherson R.I. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray. *Proteomics* 2003;3:2147–54.
4. Belov L., Huang P., Chrisp J.S., Mulligan S.P., Christopherson R.I. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells B. *Journal of Immunological Methods* 2005;305:10–9.
5. White S.L., Belov L., Barber N., Hodgkin P.D., Christopherson R.I., Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by la,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leukemia Research* 2005;29:1141–51.
6. Campbell C.J., O'Looney N., Chong Kwan M., Robb J.S., Ross A.J., Beattie J.S., Petrik J. & Ghazal P. A cell interaction microarray for blood phenotyping. *Anal Chem* 2006;78:1930–8.
7. Ellmark P., Belov L., Huang P., Soon Lee C., Solomon M.J., Morgan D.K., Christopherson R.I. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers. *Proteomics* 2006;6:1791–802.
8. Woolfson A., Stebbing J., Tom B., Stoner D.M., Gilks W.R., Kreil D.P., Mulligan S.P., Belov L., Chrisp J.S., Errington W., Wildfire A., Erber W.N., Bower M., Gazzard B., Christopherson R.I., Scott M.A. Conservation of unique cell-surface CD antigen mosaics in HIV-1-infected individuals. *Blood* 2005;106(3):1003–7.
9. Liu A.Y. Differential Expression of Cell Surface Molecules in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 2000;60:3429–34.
10. Ko I.K., Kato K. & Iwata H. Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker. *Biomaterials* 2005;26:687–96.
11. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А., Овчинина Н.Г., Бутылин А.А., Атауллаханов Ф.И., Воробьев А.И. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток. *Биологические мембраны* 2008;4:277–84.
12. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки. Некоторые новые подходы к проведению анализа. LAP Lambert Academic Publishing & Co. KG-2010. 158 с. ISBN 978-3-8433-0053-7.
13. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Под редакцией С. Херингтона и Дж. Макги. М.: Мир, 1999.
14. Саркисов Д.С., Петров Д.С. Микроскопическая техника. М.: Медицина, 1996. 544 с.