

**Конъюгат на основе инвертазы для оценки качества вакцин
с помощью персонального глюкометра**

А.В. Кольцова, Е. И. Михневич, А.Н. Соломоненко

Научный руководитель: доцент, к.х.н. Е.В. Дорожко

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: avk272@tpu.ru

Invertase-based conjugate for vaccine quality assessment using a personal glucose meter

A.V. Koltsova, E.I. Mikhnevich, A.N. Solomonenko

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Ph.D. E.V. Dorozhko

Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: avk272@tpu.ru

Abstract. *Currently, vaccine development requires significant time and financial costs, and their quality assessment requires the use of complex and expensive methods. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while remaining one of the most common vaccine quality control methods, requires a long analysis time and often uses horseradish peroxidase (HRP) as an enzyme label. HRP production is characterized by high cost and low product yield, which stimulates the search for alternative enzyme labels. In this study, a new strategy for synthesizing a conjugate based on invertase and immunoglobulins of class G is proposed. Invertase, which catalyzes the hydrolysis of sucrose to form glucose, allows the use of a personal glucose meter to record the analytical signal. This significantly simplifies and accelerates the process of assessing the quality of immunobiological products, making it more accessible to laboratories with limited resources and for express tests. The aim of the work is to develop a conjugate based on invertase and antibodies in an immunoassay using a glucose meter. The developed method, based on the use of a personal glucose meter, will provide a convenient, fast and cost-effective way to control the quality of vaccines, and will also be potentially suitable for use in various conditions.*

Key words: *invertase, enzyme immunoassay, glutaraldehyde, glucose meter, hepatitis A virus.*

Введение

Успешная разработка вакцин представляет собой довольно длительный и трудозатратный процесс, требующий участия высококвалифицированных специалистов. На выпуск эффективного и безопасного препарата, в первую очередь, влияют результаты доклинических и клинических исследований [1].

Характеристики вакцин определяются в соответствии с общими требованиями, предъявляемыми к биологическим препаратам как Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), так и национальными контролирующими органами. Для оценки качества вакцин используют разнообразные физико-химические и иммунохимические методы, такие как, ионно-обменная хроматография, УФ-спектроскопия, гель-электрофорез и иммуноферментный анализ (ИФА) [2]. Наиболее распространённым является ИФА, который заключается в выявлении и количественном определении комплексов антиген-антитело с помощью ферментных меток конъюгатов [3]. Однако этот метод контроля, как и остальные, требует длительного времени анализа.

Также в современных ИФА наборах используют ферментную метку – пероксидаза хрена (HRP). Она включена примерно в 80 % всех конъюгатов антител [4]. Этот фермент способен катализировать реакцию пероксида водорода с определенными электронодонными субстратами до получения окрашенного продукта, что позволяет проводить диагностические анализы с помощью спектрофотометрических методов. Однако производство пероксидазы

характеризуется значительными затратами при небольшом выходе продукта (2,52–3,50 г/кг корней хрена) [4].

Цель исследования – заменить используемую ферментную метку пероксидазы хрена (HRP) в конъюгатах для ИФА на более дешёвый и доступный фермент – инвертазу (Inv). Выбранный фермент имеет широкий спектр сырья, катализирует гидролиз сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы и, за счет образования свободной глюкозы, позволяет использовать персональный глюкометр для измерения аналитического сигнала при оценке качества вакцин. Разработанный метод оценки качества вакцин с использованием персонального глюкометра будет отличаться удобством и быстротой реализации.

Экспериментальная часть

В работе использованы набор реагентов для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита А (АО «Вектор Бест», Россия), набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса гепатита А (АО «Вектор Бест», Россия), глутаровый альдегид (ГК «Chem-Portal», Китай) и инвертаза (ООО «Торговый дом «Биопрепарат», Россия). Для инкубации биологических слоев использовали термостатируемый шейкер BioShake IQ (Quantifoil Instruments GmbH, Германия). Количество образовавшейся глюкозы определяли с помощью глюкометра и тест-полосок «Contour TS» (Ascensia Diabetes Care Holdings AG, Швейцария).

Синтез конъюгата на основе иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу гепатита А (ВГА) и инвертазы (Inv) проводили поэтапно путем ковалентного сшивания с помощью глутарового альдегида. Очистку конъюгата (IgG-Inv) осуществляли диализом против фосфатно-буферного раствора (pH 6,86) при 4 °C в течение 24 часов.

Очищенный конъюгат IgG-Inv апробировали на специальном планшете с иммобилизованными моноклональными антителами к антигену ВГА. Для этого в лунки планшета вносили по 100 мкл готовых контрольных положительных (инактивированные антигены ВГА) и контрольных отрицательных (инертные белки) образцов и осуществляли первую инкубацию (37 °C, 400 об/мин, 60 мин). После инкубации антигенов ВГА проводили четырехкратную отмывку от остатков биологического материала путем последовательного опустошения и внесения промывочного раствора ФСБ-Т в объеме по 350 мкл на каждую лунку планшета. Далее в промытые лунки вносили синтезированный конъюгат IgG-Inv в объеме по 100 мкл. Проводили вторую инкубацию (37 °C, 400 об/мин, 60 мин). По завершении инкубации осуществляли двукратную отмывку раствором ФСБ-Т по аналогии первого этапа инкубации.

Для запуска каталитического процесса в рабочие лунки планшета вносили по 50 мкл субстрата – сахарозы (pH 4). Проводили инкубацию сахарозы (45 °C, 400 об/мин, 20 мин). Инвертаза проявляет ферментную активность в кислой среде, в то время как персональный глюкометр измеряет содержание глюкозы в слабощелочной среде. Для измерения аналитического сигнала проводили смену буфера: растворы сахарозы переносили в заранее подготовленные лунки с 50 мкл Трис-буфера (pH 9). В полученных растворах определяли концентрацию глюкозы с помощью персонального глюкометра «Contour TS».

Результаты

Установлено, что синтезированный конъюгат IgG-Inv позволяет качественно идентифицировать положительные стандартные образцы (K+) от отрицательных (K-). Результаты анализа определения уровня глюкозы после проведения ИФА представлены в табл. 1.

Таблица 1

Значения концентрации глюкозы от времени ферментного гидролиза

τ, мин	Концентрация глюкозы, ммоль/л	
	K+	K-
1	19,50	13,80
10	20,35	14,55
20	20,60	15,85
30	20,55	16,35
60	20,60	17,05

Данные из табл. 1 также представили в графическом варианте на рис. 1.

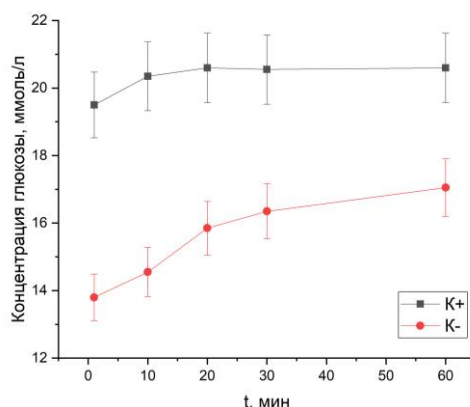


Рис. 1. Значения концентрации глюкозы от времени ферментного гидролиза

Из результатов анализа видно, что на первых минутах измерения значения контрольных положительных и отрицательных образцов отличаются в 1,5 раза. Максимальное время гидролиза сахарозы соответствует 20 минутам. Полученные результаты могут быть рекомендованы для дальнейшего определения ВГА в вакцинах с помощью персонального глюкометра.

Заключение

Таким образом, удалось синтезировать конъюгат на основе инвертазы и иммуноглобулинов. Конъюгат IgG-Inv апробирован на модельных растворах. При дальнейшей доработке конъюгата можно добиться количественного определения антигенов персональным глюкометром, что может значительно упростить и ускорить оценку качества вакцин.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№25-23-00175).

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А. Актуальные проблемы вакцинопрофилактики в Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 1. – С. 9–19.
2. Metz B. et al. Quality-control issues and approaches in vaccine development // Expert review of vaccines. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 227–238.
3. Alhajj M., Zubair M., Farhana A. Enzyme linked immunosorbent assay // StatPearls. 2023.
4. Патент № 2353652 РФ МПК C12N 9/02. Способ получения фермента пероксидазы из корней хрена / Бочков Д.В., Толстикова Т.Г., Брызгалов А.О., Хвостов М.В. Заявлено 27.09.2007, Оpubл. 27.04.2009, Бюл. № 12. – 11 с.