

УДК: 571.27:57.083

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ УРОВНЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

Кан София А.*¹, Тлеулиева Райхан Т.¹, Абдолла Нуршат¹, Нургалиева Нагира М.¹, Перфильева Юлия В.¹, Остапчук Екатерина О.¹

¹ РГП на ПХВ «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», ул. Досмухамедова 86, 050012, тел. +77272937092, Алматы, Республика Казахстан;

*Автор-корреспондент: kan.soofiya@gmail.com

АННОТАЦИЯ

В работе представлена разработка опытного варианта иммуноферментной тест-системы для количественного определения альфа-фетопротеина (АФП) человека с использованием моноклональных антител (МКА). Проведено восстановление гибридомных линий 1Е3 и 1С7 после длительного хранения, их культивирование, реклонирование и оценка стабильности продукции антител. Установлено, что линии 1Е3 и 1С7 сохраняют устойчивую секрецию высокоспецифичных МКА против АФП. Получены препаративные количества антител *in vitro* и *in vivo*. Концентрация МКА превышала 1 мг/мл, а их специфическая активность подтверждена в непрямом ИФА. На основе МКА 1С7 и 1Е3 проведена оптимизация параметров сэндвич-ИФА, включая выбор захватывающего антитела, определение оптимальной концентрации иммобилизации и рабочего разведения пероксидазного конъюгата. В качестве первого антитела выбрано МКА 1С7, обеспечивающее более высокий сигнал и лучшую линейность калибровочной зависимости. Разработанный вариант тест-системы продемонстрировал специфическую зависимость оптической плотности от концентрации АФП в исследуемом диапазоне, что подтверждает функциональную пригодность выбранной пары антител для построения диагностического набора. Полученные результаты создают основу для дальнейшей оптимизации условий анализа, направленной на повышение его аналитической чувствительности и воспроизводимости.

Ключевые слова: альфа-фетопротеин, иммуноферментный анализ, диагностика, тест-система

ВВЕДЕНИЕ

Альфа-фетопротеин (АФП) – это гликопротеин, который синтезируется в желточном мешке во время эмбрионального развития и способствует росту клеток и тканей [1]. У взрослых людей АФП присутствует в низких концентрациях (5-8 нг/мл), что связано с процессами регенерации клеток и кроветворения [2]. Однако повышение уровня АФП может сигнализировать о наличии патологий, таких как аномалии в развитии плода и различные виды рака. Определение уровня АФП в крови активно используется для контроля за состоянием плода во время беременности, а также в диагностике заболеваний печени, включая цирроз, хронические гепатиты и гепатобластому, и ряда злокачественных опухолей, таких как герминогенные опухоли яичников и яичек, а также опухоли поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта [1]. Кроме этого, АФП играет ключевую роль в диагностике гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), где своевременное выявление заболевания и эффективное лечение являются важными факторами для повышения успешности терапии и снижения экономических затрат на здравоохранение [3]. Несмотря на практическую значимость, на рынке Республики Казахстан отсутствуют отечественные тест-системы для количественного определения уровня АФП в сыворотке и плазме крови. Создание такого инструмента позволит обеспечить независимость отечественного здравоохранения от импортных диагностических изделий, расширить доступность современных методов ранней диагностики и мониторинга заболеваний, а также снизить затраты на их проведение.

Целью настоящего исследования была разработка и экспериментальная апробация опытного варианта тест-системы на основе ИФА для определения АФП человека с

использованием полученных гибридомных линий, продуцирующих специфические моноклональные антитела (МКА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы

В работе использовали гибридомные клеточные линии 1Е3, 1С7 и 1G4, продуцирующие МКА к АФП, созданные в период с 1995 по 1999 годы коллективом лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии (ЛМИИ) в Институте молекулярной биологии и биохимии (ИМББ) им. М.А. Айтхожина. Для тестирования гибридом использовали АФП человека, любезно предоставленный проф. О.В. Фурсовым (Лаборатория биохимии зерновых культур ИМББ) в 1993-1994 гг.

В работе также были использованы половозрелые мыши аутбредной линии CD1 и мыши инбредной линии BALB/c. При проведении экспериментальных работ мышей содержали в поликарбонатных клетках (до 5 мышей в клетке) в помещении вивария при ИМББ им. М.А. Айтхожина при температуре 23 ± 3 °C при естественном световом цикле. Эвтаназию осуществляли цервикальной дислокацией. Все животные получали гуманный уход и обращение; протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (выписка из протокола заседания №1 от 17.05.2024г.).

Культивирование гибридомных линий

Криопробирки с клетками используемых гибридомных линий (1Е3, 1С7, 1G4) извлекали из жидкого азота и размораживали на водяной бане при 37 °C. Суспензию клеток тщательно ресуспензировали и отмывали центри-

фугированием в 40 мл бессывороточной среде RPMI-1640 (Gibco, США) при 160g в течение 10 мин при 20 °С. После этого осадок ресуспендировали в 4-5 мл полной культуральной среды (ПКС) на основе RPMI-1640 содержащей 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 2 мМ глутамина и 100 мг/мл стрептомицин/пенициллин (Sigma-Aldrich), пируват (100X) (Sigma-Aldrich) и 50 мкМ 2-меркаптоэтанол (МЭТ) (Sigma-Aldrich) и культивировали при 37 °С и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе в концентрации, не превышающей 2х10⁶ клеток на 1 мл. На различных этапах культивирования концентрация FBS составляла 10-20 %. Клетки инкубировали до восстановления полной жизнеспособности культуры, затем использовали в экспериментах. Оценку жизнеспособности клеток осуществляли методом трипанового-синего окрашивания с подсчетом в камере Горяева с использованием инвертированного микроскопа OPTON (Leica, США).

Накопление гибридомных клеток проводили в чашках Петри емкостью 5-8 мл, далее культуры поддерживали в чашках Петри емкостью до 25 мл. Культуры пассировали через каждые 3-4 дня с плотностью посева 400-700 тыс./мл на 8-10 % ПКС. Гибридомы поддерживали *in vitro* в течение 10-15 пассажей периодически, проверяя на продукцию антител. Культуральную среду собирали центрифугированием и замораживали при -20 °С.

Накопление клеточной массы гибридомных клеток в препаративных количествах проводили путем культивирования *in vivo* в виде асцитных опухолей в мышцах линии BALB/c [4]. Мышам предварительно за 5 дней до введения гибридомных клеток вводили внутривенно пристан 0,5 мл/мышь. Суспензию гибридомных клеток вводили в ФСБ 7-9 млн./мышь, также внутривенно. Асцитную жидкость собирали на 18-23 день после введения.

Криоконсервацию клеток проводили в среде, содержащей 90% FBS и 10% диметилсульфоксида (ДМСО) (Sigma) в объеме 1 мл с 2-7 млн. кл. Криопробирки помещали в специальный контейнер и выдерживали при -80 °С 2-5 дней, затем переносили в дьюар с жидким азотом для хранения.

Получение макрофагов из брюшной полости мышей

Мышь линии CD1 умерщвляли цервикальной дислокацией. Для дезинфекции тушку животного помещали в 70% спирт этанол на 1-3 мин. Затем в брюшную полость вводили 5 мл среды, содержащая 10% FBS и гепарина из расчета 500 ед. на 100 мл. После массажа из надреза осуществляли аспирацию брюшной жидкости. К полученной клеточной суспензии добавляли 10–15 мл бессывороточной среды и отмывали с последующим центрифугированием при 1000 об./мин, 20 °С, 10 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл ПКС. Подсчет макрофагов проводили с использованием камеры Горяева с применением краски трипанового синего. Фидерную подложку готовили в разных емкостях в зависимости от концентрации клетки в ПКС, содержащей 20% FBS и пируват. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂.

Субклонирование и реклонирование линий гибри-

домных клеток

Субклонирование и реклонирование клеток гибридных линий проводили методом лимитирующего разведения, заключающегося в последовательном разведении клеточной суспензии [5]. После подсчета клеток проводили последовательные разведения 100, 20 и 10 кл./мл. Субклонирование и реклонирование проводили в 2-х повторях в 96- ячеечных планшетах с фидерной подложкой в ПКС, содержащей 20% FBS.

Осаждение иммуноглобулинов из культуральной среды и асцитной жидкости

Сульфатную фракцию МКА получали по стандартной методике [6]. Для выделения МКА из культуральной жидкости использовали метод высаливания белков 45% раствором (NH₄)₂SO₄, а из асцитной жидкости раствором 2,53M Na₂SO₄ при комнатной температуре. Сульфатный осадок растворяли в 1-3 мл PBS с последующим диализом против PBS. Отдиализованные преципитаты разводили 1:1 в растворе глицерина и хранили при -20 °С. Концентрацию иммуноглобулинов определяли спектрофотометрически на ИФА-анализаторе Microplate Reader MRX-A2000 (K LAB, Южная Корея) при длине волны 280 нм по формуле (1):

$$C \text{ (мг/мл)} = \text{ОП (280 нм)} \times N / 1,35, (1)$$

где N- кратность разведения антител, 1,35 – коэффициент экстинкции для иммуноглобулинов.

Непрямой ИФА

Непрямой вариант ИФА проводили согласно общепринятой методике [7]. Для этого в лунки полистироловых планшет (Nunc, США) наносили АФП человека, растворенный в 10 мМ КББ (карбонатно-бикарбонатный буфер) в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение 18 ч при 4 °С. Затем планшеты отмывали от несвязавшегося с пластиком антигена КББ. Для устранения неспецифической сорбции на пластик его обрабатывали 0,5% раствором желатина в том же буферном растворе. Затем 1 час инкубации при 37 °С в термо шейкере CRPI-412 (CAPP, Китай). После 2-х отмывок вносили исследуемые образцы и инкубировали планшеты в течение 2 ч при комнатной температуре, отмывали 3 раза ФСБТ (фосфатно-солевой буфер Твин-20), вносили конъюгат (антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена) и инкубировали дополнительно 2 ч при комнатной температуре. Далее вносили ТМВ и через 10–20 мин после его внесения добавляли стоп-реагент. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с использованием ИФА-анализатора.

Сэндвич-ИФА

Сэндвич ИФА проводили по стандартной методике [8]. Планшеты сенсibilizировали первыми МКА в оптимальной концентрации в 5-10мМ КББ, инкубируя их в течение 18 ч при 4 °С. Затем блокировали 0,5% раствором желатина и отмывали ФСБТ. Далее вносили различные концентрации тестируемого антигена в ФСБТ и инкубировали 2 ч при 20 °С, отмывали 3 раза ФСБТ и добавляли конъюгат вторых антител в оптимальной концентрации. После инкубации и отмывок вносили субстратную смесь. Реакцию останавливали внесением стоп-реагента и регистрировали оптическую плотность при 450 нм на ИФА-анализаторе. Отработку оптимальных условий проведения

сэндвич-ИФА разработанной тест-системой проводили путем изменения и подбора оптимальных условий всех описанных выше процедур.

Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали методами математической статистики на персональном компьютере с использованием прикладных программ Prizm 6 software (Graph Pad) и стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Восстановление гибридом, продуцирующих МКА против АФП человека

В ЛМНИ ИМББ им. М.А. Айтхожина были получены и охарактеризованы в 1995-1999-ых годах МКА к АФП человека [9]. Установлено, что данные МКА высокоспецифичны и могут применяться в дальнейшем для получения иммуноферментных диагностикумов. Гибридомные линии 1Е3, 1С7 и 1G4 были заморожены в криобанке. Работа по реанимированию этих гибридом после длительного хранения включала: размораживание клеток, культивирование, тестирование на зараженность микоплазмами, деконтаминацию от заражения, реклонирование, ИФА-анализ, а также наработку МКА *in vitro* и *in vivo*.

Гибридомы 1Е3, 1С7 и 1G4 были разморожены на фидерном слое перитонеальных макрофагов мышей линии CD1, которые были предварительно получены и внесены в лунки 24-луночных планшетов. После разморозки гибридомы продемонстрировали удовлетворительную жизнеспособность (65–80%). Первая смена ПКС осуществляли на 3–5 день при заметном увеличении количества клеток. При достижении в лунках плотности клеток 30–50% провели тестирование на продукцию специфических антител (Рисунок 1а)

После длительного хранения для стабилизации продукции МКА провели повторное субклонирование и реклонирование гибридом методом лимитирующих разведений. Субклонированию подверглась только гибридома 1G4, у которой по мере роста и последующих пассажей наблюдалось уменьшение продукции МКА. С этой целью 1G4-клетки в высокой плотности (100 кл./мл) пассивировали дважды на фидерном слое. К сожалению, после второго субклонирования секреция МКА прекратилась, поэтому в дальнейших работах данную линию не использовали.

Реклонирование 1Е3- и 1С7-клеток осуществляли в конечном разведении 10 кл./мл на фидерном слое для повышения эффективности размножения гибридомных клеток. Все моноклоны в ИФА были позитивны. Последовательным наращиванием от ячеек в планшетах до чашек Петри с увеличивающимся размером моноклоны культивировали до необходимого количества клеток. Некоторые моноклоны переводили в массовые культуры, а часть замораживали в жидком азоте. На каждом этапе культивирования среды испытывали на продукцию антител. Обе клеточные линии показали при длительном культивировании стабильную продукцию МКА и хорошие ростовые свойства. (Рисунок 1б). Из рисунка 3 видно, что гибридомы 1Е3 и 1С7 после восстановления, деконтаминации и реклонирования сохранили стабильную секрецией специфических МКА против АФП и пригодны для дальнейшей разработки диагностического набора реагентов.

Наработка препаративных количеств МКА против АФП *in vitro* и *in vivo*

Наработка препаративных количеств МКА против АФП *in vitro* и *in vivo*

Накопления клеточной массы и МКА против АФП в препаративных количествах проводили путем культивирования гибридомных клеток *in vitro* и *in vivo*. Культуры реклонированных гибридомных клеток 1Е3 и 1С7 поддерживали *in vitro* в течение 10-15 пассажей периодически, проверяя на продукцию МКА. Культуральную среду собирали центрифугированием и замораживали при -20 °С. Для другого подхода накопление МКА проводили *in vivo* в виде асцитных опухолей в мышах линии BALB/c. Асцитную жидкость собирали на 18-23 день после введения.

МКА из культуральной жидкости сконцентрировали преципитацией насыщенным раствором сульфата аммония, а из асцитной жидкости раствором 2,53 М сульфата натрия при комнатной температуре по стандартной методике [6]. Отдиализованные преципитаты разводили 1:1 в растворе глицерина и хранили при -20 °С. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм по формуле [8].

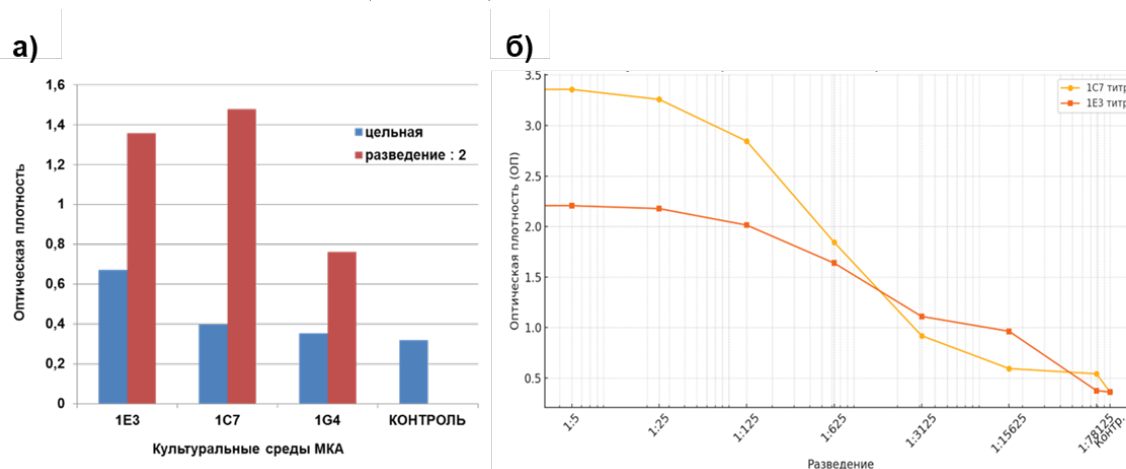


Рисунок 1. а) Оценка продукции МКА в культуральной среде гибридомных линий 1Е3, 1С7 и 1G4 после разморозки; **б)** и оценка титра МКА против АФП в культуральной среде 1Е3- и 1С7-клеток после реклонирования; длина волны 450 нм

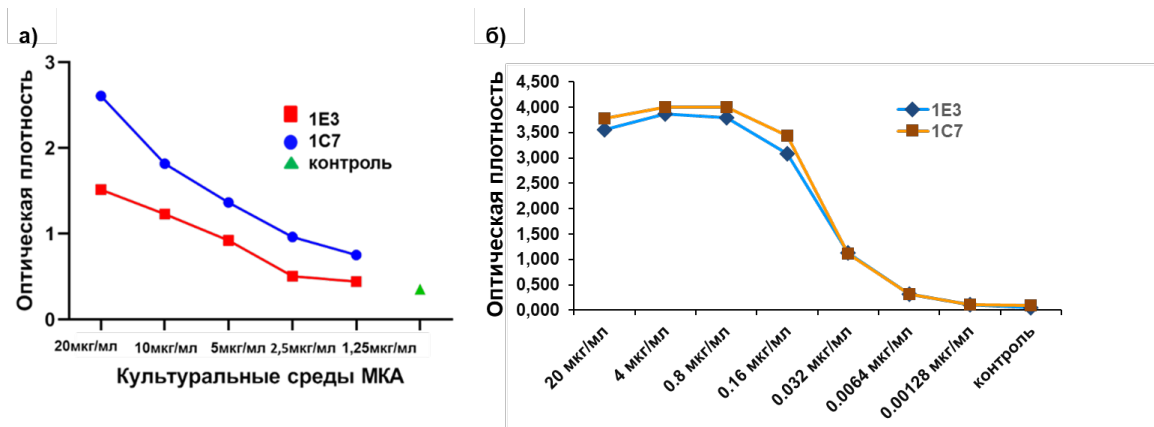


Рисунок 2. Результаты титрования сульфатных фракций МКА клеток линий 1Е3 и 1С7. а) из культуральной среды; б) из асцитных жидкостей; длина волны 450 нм

Концентрации МКА из культуральной среды составила 1,26 мг/мл для 1Е3 линии и 1,22 мг/мл для 1С7-клеток, из асцитной жидкости 4,24 и 2,44 мг/мл для 1Е3- и 1С7-клеток, соответственно.

После выделения МКА из культуральной и асцитной жидкостей оценили их специфическую активность в непрямом варианте ИФА. В качестве отрицательного контроля брали значения оптической плотности лунок с ФСБТ, не содержащих МКА (Рисунок 2).

Всего было получено по более чем 1 мг каждого из МКА, что являлось достаточным для апробации и постановки в модельных экспериментах варианта тест-системы определения АФП на основе сэндвич ИФА

Отработка условий проведения варианта тест-системы определения АФП на основе сэндвич-ИФА

Следующий этап была разработка сэндвич варианта ИФА для выявления АФП на основе полученных нами МКА 1С7 и 1Е3, специфичных к пространственно удаленным эпитомам АФП. Для постановки сэндвич-ИФА определяли способность обоих МКА сенсibilизироваться на поверхности лунок полистироловых планшетов и оптимальную концентрацию первых антител для иммобилизации в прямом варианте. Для этого сульфатные фракции МКА из жидкостей титровали путем 2х-кратных разведений в растворе КББ от 10 до 0,0625 мкг/мл. Время ин-

кубации 18 ч при 4 °С. После 2-разовой отмывки вносили 200 мкл 0,5% раствор желатина. Время инкубации 1 ч на термошейкере. После инкубации и 2-разовой отмывки ФБСТ внесли по 100 мкл конъюгата RAM (Rabbit Anti-Mouse) в ФСБТ в разведении 1:3000. Далее отмывки 3 раза и внесли 100 мкл субстратной смеси. После остановки реакции измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты анализа представлены на Рисунке 3а.

В сэндвич-ИФА в качестве первого антитела было решено использовать МКА 1С7, поскольку он обеспечивал более высокий сигнал и лучшую линейность калибровки при низких концентрациях, при этом антиген, распознаваемый 1С7, сохранял доступность после захвата эпитопа. Таким образом, при разработке сэндвич-ИФА решили использовать вариант, где в качестве первых – МКА 1С7, а в качестве вторых – конъюгат на основе МКА 1Е3.

После чего, проводили определение рабочего разведения, полученного конъюгата, состоящего из МКА 1Е3, конъюгированных с пероксидазой хрена. Для этого в лунки планшет вносили АФП (5мкг/мл) и титровали конъюгат по выше приведенной методике от 40 до 0,6 мкг/мл. Результаты показали, что рабочее разведение конъюгата соответствует 10^{-8} мкг/мл (Рисунок 3б).

Далее провели оптимизацию сборки и условий проведения ИФА. В результате апробации различных вариаций анализа был установлен оптимальный вариант. В уста-

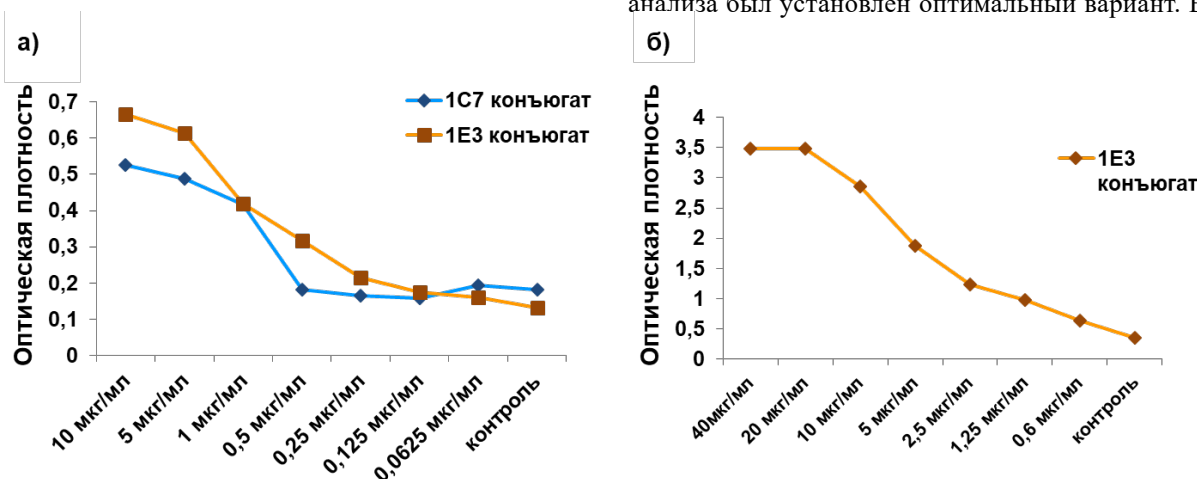


Рисунок 3. а) Результаты оценки иммобилизации первых МКА 1С7 и 1Е3; б) Результаты титрования конъюгата на основе МКА 1Е3 в сэндвич-ИФА; длина волны 450 нм

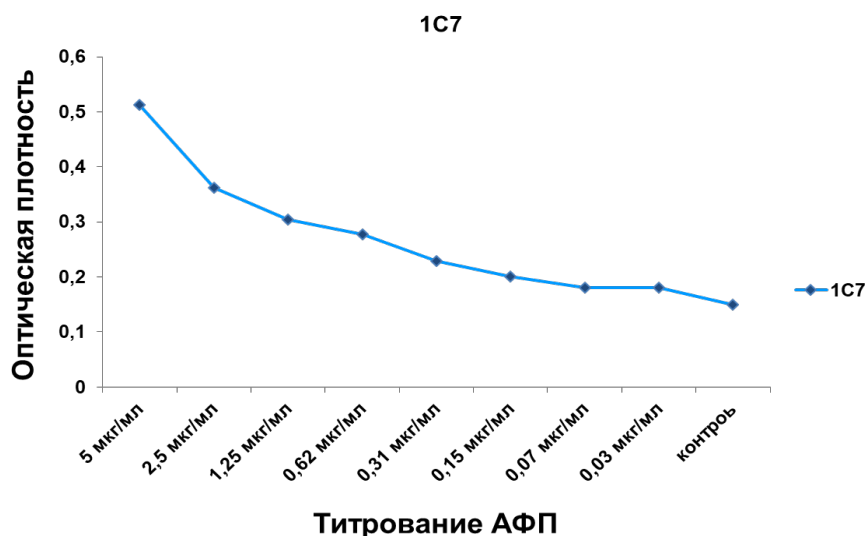


Рисунок 4. Результаты титрования АФП в разработанном варианте сэндвич-ИФА, длина волны 450 нм

новленной концентрации МКА 1С7 сорбировали по 100 мкл в лунках полистирольных планшет в течение 1ч при 37 С. После инкубации с желатином и отмывок внесли по 100 мкл приготовленных 2-кратных разведений АФП от 5 мкг/мл до 0,03 мкг/мл в ФСБТ. После отмывок вносили 100 мкл конъюгата 1ЕЗ в оптимальной концентрации 10 мкг/мл. С использованием данного опытного варианта тест-системы нами были проведены эксперименты по титрованию АФП (Рисунок 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведённой работы были успешно восстановлены гибридные линии 1ЕЗ и 1С7, продуцирующие МКА против АФП человека. После разморозки и реклонирования обе линии сохранили стабильную продукцию специфических антител и ростовые свойства, что позволило использовать их для дальнейших исследований.

Были получены препаративные количества МКА против АФП человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Из культуральной среды и асцитной жидкости выделены высокоспецифичные антитела с концентрацией более 1 мг/мл. Проведённый ИФА-анализ подтвердил их высокую активность и пригодность для использования в диагностических целях.

Проведена оптимизация параметров постановки сэндвич-варианта ИФА на основе пары МКА 1С7 (захватывающее антитело) и 1ЕЗ (конъюгат). Определены оптимальные условия иммобилизации, концентрации реагентов и рабочие разведения конъюгата. Полученные результаты показали наличие специфической зависимости между концентрацией АФП и уровнем сигнала, что свидетельствует о функциональной активности, выбранной пары антител. Однако чувствительность полученного варианта анализа оказалась ограниченной, что, вероятно, связано с особенностями сорбции первых антител и требует дальнейшей оптимизации условий постановки реакции (включая подбор концентраций, буферных условий и формата

иммобилизации).

Таким образом, полученные результаты создают методическую и экспериментальную основу для дальнейшего совершенствования ИФА тест-системы для определения АФП. Дальнейшие исследования будут направлены на повышение аналитической чувствительности, оценку воспроизводимости и проведение валидации на клинических образцах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе успешно восстановлены и охарактеризованы гибридные линии 1ЕЗ и 1С7, продуцирующие высокоспецифичные моноклональные антитела против альфа-фетопротейна человека. Получены препаративные количества антител с подтверждённой функциональной активностью. Проведена оптимизация параметров сэндвич-варианта ИФА на основе пары МКА 1С7 и 1ЕЗ, продемонстрировавшая специфическую зависимость сигнала от концентрации АФП. Полученные результаты формируют основу для дальнейшего повышения аналитической чувствительности и валидации разработанной тест-системы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта BR27195585 «Создание новых отечественных тест-систем и поиск потенциальных биомаркеров для диагностики социально-значимых заболеваний», финансируемого Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.Е. – концепция и руководство работой; Т.Р., Н.Н., А.Н. – проведение экспериментов; А.Н., Т.Р. – обсуждение результатов исследования; К.С. – написание текста; О.Е., П.Ю. – редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Mees C., Bakker J., Szpirer J., Szpirer C. Alpha-fetoprotein: from a diagnostic biomarker to a key role in female fertility // *Biomark Insights*. – 2007. – Vol.1. – P.82-5.
2. Munson P.V., Adamik J., Butterfield L.H. Immunomodulatory impact of α -fetoprotein // *Trends Immunol.* – 2022. – Vol.43. – P.438-448.
3. Głowska-Ciemny J., Szymański M., Kuszarska A., Malewski Z., von Kaisenberg C., Kocylowski R. The Role of Alpha-Fetoprotein (AFP) in Contemporary Oncology: The Path from Diagnostic Biomarker to an Anticancer Drug // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol.24. – P.2539
4. Фридлянская И.И. Получение моноклональных антител (гибридная технология) // *Методы культивирования клеток*. – Л.: Наука, 1987. – С. 194-205
5. Underood P.A., Bean R.A. Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas // *J. Immunol. Meth.* – 1988. – Vol. 107. – P. 119-129
6. Tung A.S. Production of large amounts of antibodies nonspecific immunoglobulins and other serum proteins in ascetic fluids of individual mice and guinea pigs // *Meth. Enzymol.* – 1983, – Vol. 93. – P. 12-23
7. Campbel A.M. Monoclonal antibody technology. Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, – 1984. – P.367
8. Егоров, А. М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Соболев, В. И. Доронин. – М. : Высшая школа, 1991. – С. 288
9. Сinenko С.А. Моноклональные антитела к альфа-фетопротеину и хориогонадотропину человека и их использование в эпителиальном анализе и диагностических тест-системах. Диссертация, Алматы. – 1999.
10. De Mees C., Bakker J., Szpirer J., Szpirer C. Alpha-fetoprotein: from a diagnostic biomarker to a key role in female fertility // *Biomark Insights*. – 2007. – Vol.1. – P.82-5.
11. Munson P.V., Adamik J., Butterfield L.H. Immunomodulatory impact of α -fetoprotein // *Trends Immunol.* – 2022. – Vol.43. – P.438-448.
12. Głowska-Ciemny J., Szymański M., Kuszarska A., Malewski Z., von Kaisenberg C., Kocylowski R. The Role of Alpha-Fetoprotein (AFP) in Contemporary Oncology: The Path from Diagnostic Biomarker to an Anticancer Drug // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol.24. – P.2539
13. Fridlyanskaya I.I. Production of monoclonal antibodies (hybridoma technology). In: *Methods of Cell Culture*. – Leningrad: Nauka, 1987. – P. 194–205. [Fridlyanskaya I.I. Poluchenie monoklonaľnykh antitel (gibridomnaya tekhnologiya) // *Metody kul'tivirovaniya kletok*. – L.: Nauka, 1987. – S. 194–205.]
14. Underood P.A., Bean R.A. Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas // *J. Immunol. Meth.* – 1988. – Vol. 107. – P. 119-129
15. Tung A.S. Production of large amounts of antibodies nonspecific immunoglobulins and other serum proteins in ascetic fluids of individual mice and guinea pigs // *Meth. Enzymol.* – 1983, – Vol. 93. – P. 12-23
16. Campbel A.M. Monoclonal antibody technology. Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, – 1984. – P.367
17. Egorov AM, Sobolev AP, Doronin VI. Theory and Practice of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. – Moscow: Vysshaya shkola; 1991. – P. 288 [Egorov A.M., Sobolev A.P., Doronin V.I. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza. – M.: Vysshaya shkola, 1991. – 288 S.]
18. Sinenko SA. Monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein and chorionic gonadotropin and their application in epitope analysis and diagnostic test systems. Candidate of Sciences dissertation. Almaty: M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry; 1999. [Sinenko S.A. Monoklonaľnye antitela k al'fa-fetoproteinu i khoriongonadotropinu cheloveka i ikh ispol'zovanie v epitopnom analize i diagnosticheskikh test-sistemakh. Dissertatsiya, Almaty. – 1999.]

REFERENCES

**АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН ДЕҢГЕЙІН САНДЫҚ АНЫҚТАУҒА АРНАЛҒАН
ИММУНОФЕРМЕНТТІК ТЕСТ-ЖҮЙЕНІ ӘЗІРЛЕУ ЖӘНЕ ОҢТАЙЛАНДЫРУ**

Кан София А.*¹, Тлеулиева Райхан Т.¹, Абдолла Нуршат¹, Нургалиева Нагира М.¹, Перфильева Юлия В.¹, Остапчук Екатерина О.¹

¹ «М.А. Айтхождин атындағы молекулалық биология және биохимия институты» ШЖҚ РМК, ул. Досмухамедова 86, 050012, тел. +77272937092, Алматы, Қазақстан Республикасы;

* Хат-хабар авторы: kan.soofiya@gmail.com

АНДАТПА

Бұл жұмыста адамның альфа-фетопротеинін (АФП) сандық анықтауға арналған иммуноферменттік тест-жүйенің (ИФТЖ) тәжірибелік үлгісін моноклоналды антиденелерді (МКА) пайдалану арқылы әзірлеу нәтижелері ұсынылған. Ұзақ мерзімді сақтау жағдайынан кейін 1Е3 және 1С7 гибридомалық желілері қайта қалпына келтіріліп, оларды өсіру, қайтақлондау және антидене өндіру тұрақтылығы бағаланды. Зерттеу нәтижесінде 1Е3 және 1С7 желілерінің АФП-ға қарсы жоғары спецификалы МКА-ларды тұрақты түрде секрциялайтыны анықталды.

Антиденелердің препаративтік мөлшерлері *in vitro* және *in vivo* жағдайларында алынды. МКА концентрациясы 1 мг/мл-ден асты, ал олардың спецификалық белсенділігі жанама иммуноферменттік талдау (жанама ИФА) әдісімен расталды.

1С7 және 1Е3 МКА негізінде «сэндвич» форматындағы ИФА параметрлері оңтайландырылды, соның ішінде қармаушы (capture) антиденені таңдау, иммобилизацияның оңтайлы концентрациясын анықтау және пероксидазамен конъюгацияланған антидененің жұмысшы сұйылтуын белгілеу жүргізілді. Бірінші антидене ретінде 1С7 МКА таңдалды, себебі ол жоғары сигнал қарқындылығын және калибрлеу қисығының жақсы сызықтылығын қамтамасыз етті.

Әзірленген тест-жүйе нұсқасы зерттелген концентрациялық диапозонда оптикалық тығыздықтың АФП мөлшеріне тәуелділігін көрсетті, бұл таңдалған антиденелер жұбының диагностикалық жинақ құрастыру үшін функционалдық жарамдылығын дәлелдейді. Алынған нәтижелер талдау жағдайларын әрі қарай оңтайландыруға, оның ішінде аналитикалық сезімталдық пен қайталанымдылықты арттыруға негіз болады.

Түйінді сөздер: альфа-фетопротеин, иммуноферменттік талдау, диагностика, тест-жүйе

**DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF AN ELISA TEST SYSTEM FOR THE QUANTITATIVE
DETERMINATION OF ALPHA-FETOPROTEIN**

Kan Sofiya A.*¹, Tleulieva Raikhan.¹, Abdolla Nurshat¹, Nurgalieva Nagira M.¹, Perfilieva Yuliya V.¹, Ostapchuk Yekaterina O.¹

¹ M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Dosmukhamedov str. 86, 050012, tel. +7(727) 2937092, Almaty, Kazakhstan;

* Corresponding author: kan.soofiya@gmail.com

ABSTRACT

This study presents the development of a prototype enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test system for the quantitative determination of human alpha-fetoprotein (AFP) using monoclonal antibodies (mAbs). Hybridoma cell lines 1E3 and 1C7 were recovered after long-term storage, followed by cultivation, recloning, and evaluation of antibody production stability. Both 1E3 and 1C7 lines were shown to maintain stable secretion of highly specific anti-AFP monoclonal antibodies.

Preparative quantities of antibodies were obtained both *in vitro* and *in vivo*. The concentration of mAbs exceeded 1 mg/mL, and their specific activity was confirmed by indirect ELISA. Based on mAbs 1C7 and 1E3, key parameters of a sandwich ELISA were optimized, including selection of the capture antibody, determination of the optimal immobilization concentration, and establishment of the working dilution of the horseradish peroxidase-conjugated detection antibody. mAb 1C7 was selected as the capture antibody, as it provided higher signal intensity and improved linearity of the calibration curve.

The developed test system demonstrated a specific correlation between optical density and AFP concentration within the studied range, confirming the functional suitability of the selected antibody pair for the development of a diagnostic kit. The obtained results provide a foundation for further optimization of assay conditions aimed at improving analytical sensitivity and reproducibility.

Keywords: alpha-fetoprotein, enzyme-linked immunosorbent assay, diagnostics, test system