

THE METHOD OF DETECTION OF BIOMOLECULES FOR THE CREATION OF SENSORS BASED ON NANO-STRUCTURED Si.

P. Teselko
V. Shevchenko

In the work, the modification of photoluminescence spectra in the processing of porous silicon in aqueous solutions with different oxygen contents and aqueous solutions of amino acids was studied in order to further create a sensor sensitive to chemically active oxygen near the surface of porous silicon in the presence of various amino acids. The growth of the photoluminescence intensity at the processing of porous silicon in distilled water and the sensitivity of the intensity of photoluminescence to the oxygen content in water are revealed. It is proposed to use a change in the intensity of luminescence to study the properties of biomolecules, namely the determination of the amount of chemically active oxygen near the surface of porous silicon in the presence of various amino acids.

Changing the sizes of nanocrystals is the main reason for increasing the intensity of photoluminescence when processing porous silicon in aqueous solutions. After applying to the surface of samples of porous silicon aqueous solutions of glycine, alanine, phenylalanine, the intensity of photoluminescence varies for all samples. Changing the sizes of nanocrystals is the main reason for increasing the intensity of photoluminescence when processing porous silicon in aqueous solutions. After applying to the surface of samples of porous silicon aqueous solutions of glycine, alanine, phenylalanine, the intensity of photoluminescence varies for all samples.

Key words: photoluminescence, nanostructured porous silicon, biosensors.

DOI: <https://doi.org/10.33994/kndise.2019.64.48>
УДК 615.076

И. Е. Герасимова
Руководитель судебно-биологического отделения

*Институт судебных экспертиз по Северо-Казахстанской области
РГКП «Центр судебных экспертиз МЮ РК»*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ РЕАГЕНТОВ В СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Моноклональные антитела анти-А и анти-В (МКА) могут использоваться при исследовании жидкой крови, пятен крови и слюны для выявления групповых антигенов А и В, используя общепринятые методы исследования. Применение МКА и изогемагглютининов анти-А и анти-В в реакции абсорбции-элюции при экспертизе следов слюны увеличивает возможность установления её происхождения от невыделителя.

Ключевые слова: моноклональные антитела (МКА), групповые антигены, методы исследования, жидкая кровь, пятна крови, слюны.

Одной из главных задач судебно-биологической экспертизы является установление биологических объектов и определение их групповой принадлежности. При определении групповой принадлежности часто возникают трудности, связанные с низким титром сывороток, факторами, воздействующими на биологический объект (микробное обсеменение, различные загрязнения, воздействие химических и физических факторов, процессы гниения). Исследуемые следы не всегда имеют достаточные размеры и степень насыщенности, а получение высокоактивных изогемагглютинирующих сывороток затруднено, что затрудняет определение групповой принадлежности следов на вещественных доказательствах.

Большую роль в этом вопросе оказывают цоликлоны – моноклональные антитела (МКА), обладающие высокой специфичностью и биологической активностью. В 1975 г. Г. Келлер и К. Мильштейн разработали способ получения моноклональных антител (МКА). Клон в биологии – это колонии, образующиеся при бесполом делении одной клетки, в результате чего образуются чистые линии клеток. В иммунологии под термином «клеточный клон» подразумевается совокупность клеток, возникающих под влиянием антигена из лимфоцита, находящегося на антигенно-зависимой стадии развития. Они предложили методику получения клеточных гибридов-гибридом от слияния нормальных лимфоцитов иммунизированных животных (селезенка мышей) с культивируемыми в питательной среде клетками миеломных штаммов. От лимфоцитов гибридная клетка получает способность синтезировать определенное антитело и выживать в определенной питательной среде, а от миеломной клетки – свойство бесконечно размножаться *in vitro*, образуя гибридомный клон. Все антитела, вырабатываемые клоном, идентичны по классу молекулы, ее типу, специфичности и авидности. Они взаимодействуют только с одной антигенной детерминантой.

Методика гибридомы позволила разрешить проблему длительного производства гомогенных антител к разнообразным антигенам. В сыворотке крови и асцитической жидкости мышей, несущих гибридомную опухоль, титр антител очень высок. Такая технология получения антител является доступной и качественной, не требует их очистки.

Использование продуктов гибридомной технологии в медицине (клеточной инженерии) является примером проникновения науки в прикладные области исследования. МКА находят широкое применение в таких областях науки, как иммунология, иммуногенетика, биохимия, генетика человека, биология клетки и опухолей.

Ныне моноклональные антитела или цоликлоны – название разработанных в лаборатории Гематологического научного центра РАМН (г. Москва) и выпускаемых ООО «Гематолог» типизирующих реагентов нового поколения для определения антигенов человека. Они получены с помощью современных биотехнологических методов. Содержащиеся в них МКА продуцируются, как указывалось выше, специально сконструированными клеточными линиями мыши – гибридомами. Каждая гибридомная линия продуцирует антитела,

имеющие идентичную химическую структуру и биологическую активность и принадлежащие к одному классу иммуноглобулинов. Поэтому каждый реагент, приготовленный на основе МКА, строго специфичен, не содержит примеси других антител, балластных белков и других нежелательных компонентов; более того, отсутствие в нём каких-либо инфекционных агентов делает его полностью безопасным. Все серии каждого реагента выпускаются в соответствии с ТУ и снабжены сертификатом качества, выдаваемым после авторской проверки.

В судебно-биологической практике применяются цоликлоны СМ (судебно-медицинские): анти-А, анти-В, анти-М, анти-Н и три разновидности анти-Н (н/аб, аб, кра).

Целью работы является демонстрация возможностей использования МКА в судебно-биологической экспертной практике с применением регламентированных методов исследования. Параллельно реакции проводились с изогемагглютинирующими сыворотками.

Объектами исследования были жидкая кровь, а также кровь и слюна в виде высушенных образцов на марле.

С помощью реакции агглютинации на плоскости исследовалась жидкая кровь лиц групп А, В, АВ, и 0 (учет результатов в течение 5 мин). Во всех случаях результаты были достоверными, причем агглютинация соответствующих эритроцитов МКА наступала в первые секунды.

Пятна крови исследовали реакцией количественной абсорбции и реакцией абсорбции-элюции (РАЭ). В реакцию вводили высушенную на марле кровь различной давности: несколько суток, 3, 4, 6 месяцев, 1 и 2 года всех групп.

Реакцией количественной абсорбции положительные результаты с МКА получены лишь со следами крови давностью не более 3 месяцев (антитела вводили в реакцию в титре 1:32, абсорбция 18 ч, учет результатов в течение 5 мин на плоскости).

РАЭ со следами крови проводили по общепринятой методике. Фиксация этанолом (метанолом) в течение 15 мин. В аналогичных условиях исследовали и нефиксированный материал. Антитела вводили в реакцию в титре 1:128, абсорбция 20 ч, элюция в пробирках в физиологический раствор хлорида натрия при 56 °С.

В условиях реакции МКА были специфичны. При учете результатов во всех случаях четко выраженные агглютинаты наблюдались с нефиксированным и фиксированным материалом. Однако с фиксированным материалом агглютинаты были выражены несколько слабее и в единичных случаях антигены не были выявлены в следах крови давностью 1-3 года.

Слюну исследовали реакцией количественной абсорбции и РАЭ. Следы высушенной на марле слюны лиц выделителей и невыделителей всех групп давностью 10 суток, 2, 6, 9 месяцев, 1-3 года.

Реакцией количественной абсорбции групповые свойства А и В были выявлены МКА и изогемагглютинирующими сыворотками у лиц категории выделитель. Со слюной всех невыделителей этой реакцией

получены отрицательные результаты как с МКА, так и с изогемагглютинидами.

РАЭ проводили в соответствии с общепринятой методикой. Материал исследовали как после фиксации (кипячением), так и в нефиксированном виде. Абсорбцию осуществляли в течение 2 и 20 ч в условиях бытового холодильника, элюцию – в 0,2 % взвесь эритроцитов при 50 °С в течение 25 мин в пробирках.

Обоими реагентами антигены А и В были выявлены во всех образцах слюны лиц категории выделитель, причем с МКА анти-А лучшие результаты были получены при абсорбции в течение 2 ч с нефиксированным материалом, с антителами анти-В положительные результаты наблюдали при абсорбции в течение 20 ч с фиксированным материалом. При исследовании нефиксированного материала МКА анти-В агглютинаты почти не наблюдались, хотя проба на истощение антител иногда была положительной.

Со слюной невыделителей результат РАЭ с МКА был отрицательным, с изогемагглютинидами – положительным.

Цоликлоны СМ анти-М и анти-Н успешно используются в прямой реакции агглютинации на плоскости для исследования жидкой крови и в реакции абсорбции-элюции при исследовании пятен крови по общепринятой методике.

Цоликлоны СМ анти-Н, все разновидности (н/аб, аб, кра), используются для определения антигена Н в жидкой крови в реакциях агглютинации и в реакциях абсорбции-элюции для исследования пятен крови. Цоликлон анти-Нн/аб не выявляет Н антиген в слюне и других выделениях. Анти-Наб применяется при исследовании пятен слюны и спермы в РАЭ. Хорошо выявляет антиген Н как в группе 0(I), так и «сопутствующий» в группах А(II), В(III), слабее в АВ(IV). И не выявляет его у невыделителей в надосадочной части слюны. Цоликлон анти-Нкра так же используется для исследования пятен крови, слюны и спермы в КРА, РАЭ. Интенсивно реагирует с антигеном Н 0(I) группы и почти не выявляет «сопутствующий» антиген Н. Так же не выявляет антиген Н в надосадочной части слюны у невыделителей.

В результате исследования образцов крови и слюны с использованием МКА установлено:

1) реагенты в реакциях агглютинации, количественной абсорбции и РАЭ высокоспецифичны и активны;

2) реакцией агглютинации в жидкой крови групповые свойства выявляются во всех образцах;

3) реакцией количественной абсорбции антигены А и В достоверно выявляются в пятнах крови давностью не более 3 месяцев;

4) РАЭ антигены А и В в следах крови выявляются во всех случаях, причем лучшие результаты получены с нефиксированным материалом;

5) реакцией количественной абсорбции в образцах высушенной на марле слюны лиц категории выделитель антигены А и В выявлялись во всех случаях;

6) в следах слюны лиц категории невыделитель реакцией количественной абсорбции и РАЭ антигены А и В не выявляются (возможно,

это свойство в РАЭ может иметь значение при экспертизе следов слюны малых размеров для уточнения вывода об их происхождении от невыделителя (под контролем изосывороток анти-А и анти-В);

7) РАЭ в следах слюны лиц категории выделитель антигены А и В выявляются во всех случаях; антиген А лучше выявляется в нефиксированном материале при абсорбции в течение 2 ч. При выявлении антигена В положительные результаты были получены при исследовании фиксированного материала и абсорбции в течение 20 ч;

8) предварительная работа с образцами крови и слюны, исследование контрольных участков предмета-носителя являются обязательными.

Положительными качествами цоликлонов являются:

- кономность в использовании, так как они имеют высокий титр до 1:1024, однако, в последние годы их титр стал ниже,
- длительный срок хранения – 2 года (анти-Н-1год),
- высокая эффективность, каждая серия их тестируется на специфичность, титр, avidность,
- практически отсутствует влияние предмета-носителя.

Перелік посилань

References

1. Бернет Ф. Клеточная иммунология: пер. с англ. Москва, 1971. 256 с.

2. Горбунова О. Л., Зорина Л. Г. Проблемы экспертизы в медицине. 2004, № 13-1, т. 4.

3. Кульберг А. Я. Молекулярная иммунология. Москва, 1985. 287 с.

4. Горбунова О. Л., Зорина Л. Г. Проблемы экспертизы в медицине. 2010. т. 10. №3-4.

5. Куш А.А., Цой Л.А., Полежаев А.И. и др. Моноклональные антитела в микробиологии и вирусологии. Москва, 1985. С. 7–9.

6. Моноклональные антитела: гибридомы: новый уровень биологического анализа: пер. с англ. Москва, 1983. 416 с.

7. Петров Р. В. Иммунология. Москва, 1982.

1. Bernet, F. (1971). Kletochnaia immunologiya [Cell immunology] per. s angl. Moskva, 256 p. [in Russian].

2. Gorbunova, O. L., Zorina L. G. (2004). Problemy ekspertizy v meditsine [Expertise problems in medicine], No 13-1, t. 4. [in Russian].

3. Kulberg, A. Ia. (1985). Molekuliarnaia immunologiya [Molecular immunology] Moskva, 287 p. [in Russian].

4. Gorbunova, O. L., Zorina, L. G. (2010). Problemy ekspertizy v meditsine [Expertise problems in medicine], No 3–4, t. 10. [in Russian].

5. Kushch, A. A., Tsoi L. A., Poletaev A. I. i dr. (1985). Monoklonalnye antitela v mikrobiologii i virusologii. [Monoclonal antibodies in microbiology and virology]. Moskva, pp. 7–9.

6. Monoklonalnye antitela: gibridomy: novyi uroven biologicheskogo analiza (1983). [Monoclonal antibodies: hybridomas: new level of biological analysis] per. s angl. Moskva, 416 p. [in Russian].

7. Petrov, R. V. (1982). Imunnologia [Immunology] Moskva. [in Russian].

8. Потапов М. И., Куприна Т. А. Суд.-мед. эксперт. 1987. № 2. С. 28–31.

8. Potapov, M. I., Kuprina, T. A. (1987). Sud.-med. ekspert [Forensic-medical expert], No. 2, pp. 28–31. [in Russian].

9. Инструкция по применению Набора моноклональных антител для выявления антигенов системы AB0(H), MNSs в крови и слюне в судебно-медицинской практике. Москва, 2003.

9. Instruksiiia po primeneniiu Nabora monoklonalnykh antitel dlia vyivleniia antigenov sistemy AB0(H), MNSs v krovi i sliune v sudebno-meditsinskoï praktike (2003) [Manual to the Set of monoclonal antibodies used for detection of antigens of the AB0(H) system, MNSs in blood and saliva in forensic-medical practice]. Moskva. [in Russian].

ВИКОРИСТАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ РЕАГЕНТІВ В СУДОВО-БІОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

I. Е. Герасимова

Моноклональні антитіла анти-А і анти-В (МКА) можуть використовуватися при дослідженні рідкої крові, плями крові і слини для виявлення групових антигенів А і В, використовуючи загальноприйняті методи дослідження. Застосування МКА і ізогемаглютинінов анти-А і анти-В в реакції абсорбції-елюції при експертизі слідів слини збільшує можливість встановлення її походження від невиділятеля.

Ключові слова: моноклональні антитіла (МКА), групові антигени, методи дослідження, рідка кров, плями крові, слини.

THE APPLICATION OF MONOCLONAL REAGENTS IN FORENSIC PRACTICE

I. Gerassimova

Anti-A and anti-B monoclonal antibodies (MCA) may be used in the analysis of liquid blood, spots of blood and saliva traces in order to detect A and B blood group antigens using common methods of evidence investigation. The use of MCA and anti-A and anti-B antigens in the absorption-elution reaction during the analysis of minute saliva traces enhances the possibility of establishing the origin of the saliva at the expense of non-secretor.

Key words: monoclonal antibodies (MCA), group antigens, research methods, liquid blood, spots of blood, saliva.