



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Клиника и
исследования

Инфекционные
болезни



Иммунология и
серология



Реагенты для иммуноанализов на антитела и антигены SARS-CoV-2



SARS-CoV-2 - это новый коронавирус, вызывающий COVID-19. В марте 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку COVID-19 пандемией.

SARS-CoV-2 (рис.1) принадлежит к большому семейству вирусов с одноцепочечной РНК (+ssRNA). Бета-коронавирусы, такие как SARS-CoV, могут преодолевать видовые барьеры и вызывать у людей заболевания,

варьирующиеся от простуды до более тяжелых болезней, таких как тяжелый острый респираторный синдром (SARS, выявленный в 2003 году) и ближневосточный респираторный синдром (MERS, выявленный в 2012 году).

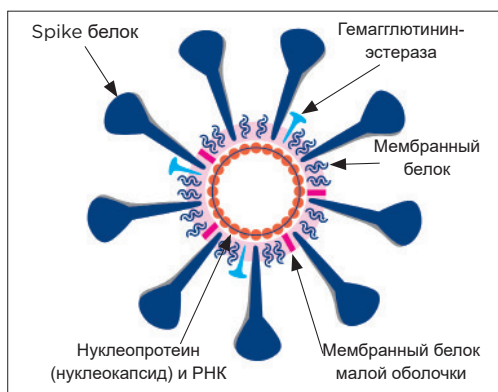


Рис. 1. Схематическое изображение SARS-CoV-2.

Антигенные тесты COVID-19

Тесты на антиген COVID-19 используются для обнаружения вирусных антигенов в клинических образцах. Уже зарегистрировано достаточное количество тестов для определения антигенов SARS-CoV-2 в США, Европе и России. Они активно используются в диагностике COVID-19.

Хотя тесты, основанные на обнаружении вирусной РНК, считаются золотым стандартом в диагностике COVID-19, специфичность лучших тестов на антигены не уступает этим



КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- ✓ Серологические тесты (антитела) на SARS-CoV-2
- ✓ Тесты на антигены SARS-CoV-2

ПЦР-тестам в реальном времени. В целом чувствительность несколько ниже, однако, поскольку тесты на антигены являются быстрыми и простыми в использовании, в некоторых случаях они представляют собой жизнеспособную альтернативу для диагностики и скрининга заболеваний.

Серологические тесты на COVID-19

Серологические тесты (антитела) используются для мониторинга наличия антител, специфичных к SARS-CoV-2, в клинической пробе. В ходе типичной инфекции В-клетки продуцируют антитела (иммуноглобулины) разных классов. Обычно антитела IgM могут быть обнаружены первыми, тогда как антитела класса IgG появляются несколько позже (см. Рис 2). Антитела IgM и IgG являются наиболее частыми мишенями в тестах на антитела COVID-19, однако недавние исследования показывают, что измерение наличия антител класса IgA может повысить чувствительность тестов (1,2).

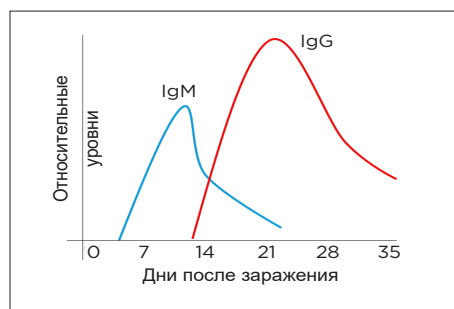


Рис. 2. Сероконверсия после типичной инфекции.

Ссылки

1. Yu, H. et al. Eur Respir J 2001526 (2020) doi:10.1183/13993003.01526-2020.
2. Tan, C. W. et al. Nat Biotechnol 38, 1073-1078 (2020).
3. Ma, H. et al. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.17.20064907> (2020) doi:10.1101/2020.04.17.20064907.

Реагенты для разработки анализов

Мы предлагаем несколько моноклональных антител (МоАт), специфичных к нуклеопротеину SARS-CoV-2 и spike RBD SARS-CoV-2. Антитела подходят для разработки тестов определения антигенов COVID-19. Все рекомендованные пары были протестированы с образцами пациентов и/или вирусными лизатами. Окончательный выбор антител еще не определен; мы продолжаем характеризовать разные пары и прислушиваемся к отзывам наших клиентов. Мы рекомендуем тестировать различные комбинации антител, поскольку эффективность работы антител в тестах зависит от платформы. Помимо моноклональных антител, мы разработали козы поликлональные антитела, специфичные к нуклеопротеину SARS-CoV-2.

Мы также предлагаем два рекомбинантных антигена SARS-CoV-2, которые можно использовать при разработке тестов на антитела COVID-19 и в качестве положительных контролей в тестах на антигены: Spike RBD и Нуклеопротеин. Кроме того, мы предлагаем моноклональные антитела, специфичные к различным классам Ig: IgA, IgG и IgM. Их можно использовать в качестве вторичных антител в серологических анализах.

Таблица 1. Кросс-реактивность выбранных пар антител к NP SARS-CoV-2 с рекомбинантным нуклеопротеином MERS-CoV.

Подложка	Детекция	MERS-COV NP (His-tag)
NP1510	NP1517	-
NP1516	NP1510	-
NP1516	C525	-
C518	C524	-
C518	C706	-
C524	NP1516	-
C524	C527	-
C524	C706	-
C527	C715	-
C706	C518	-
C715	C518	-
C715	C706	-

Моноклональные антитела, специфичные к нуклеопротеину SARS-CoV-2

Мы предлагаем несколько мышиных и кроличьих моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину SARS-CoV-2.

Исследование кросс-реактивности МоАт

Несколько комбинаций пар МоАт были протестированы на кросс-реактивность с рекомбинантными нуклеопротеинами SARS-CoV и MERS (см. Таблицу 1). Эти же пары не показали перекрестной реакции с некоторыми другими вирусами респираторных заболеваний, включая сезонные коронавирусы, вирусы гриппа А и В, респираторно-синцитиальный вирус человека и аденовирус (см. Таблицу 2).

Таблица 2. Те же пары, что и в таблице 1, были протестированы на кросс-реактивность с несколькими сезонными коронавирусами и другими вирусами, вызывающими респираторные заболевания. Кросс-реактивности не обнаружено.

Рекомбинантные антигены (компания Sino Biological)
Вирус гриппа В (B/Florida/4/2006)
Нуклеопротеин (His Tag) 40438-V08B
Вирус гриппа А H1N1 (A/California/07/2009)
Нуклеопротеин (His Tag) 40205-V08B
Коронавирус человека (HCoV-HKU1)
Нуклеопротеин (His Tag) 40642-V07E
Коронавирус человека (HCoV-OC43)
Нуклеопротеин 40643-V07E
Коронавирус человека (HCoV-229E)
Нуклеопротеин (His Tag) 40640-V07E
Коронавирус человека (HCoV-NL63)

Лизаты вирусов
HCoV E229
HCoV OC43
Парагрипп Тип 1
Парагрипп Тип 2
Парагрипп Тип 3
Вирус гриппа А (H2N2)
Вирус гриппа А (H7N9)
Вирус гриппа А (H1N1) pdm09 Guangdong-Maonan
Вирус гриппа А (H3N2) HongKong/2671/2019
Вирус гриппа А (H5N1)
Вирус гриппа В Washington 02/2019
Вирус гриппа В Phuket
Респираторно-синцитиальный вирус человека
Аденовирус

Предполагаемые области эпитопов

Точные области эпитопов не определены, однако на данный момент мы смогли разделить все антитела против нуклеопротеидов на пять эпитопов, три ближе к N-концевой части и два к С-концевой части (см. Рисунок 3). Все антитела к N-концу связываются с участком N47-A173 нуклеопротеина. C524, C706, C518 и C715 распознают структурные эпитопы в N-концевой части нуклеопротеина. C527 распознает линейный эпитоп R89-W108.

Антитела, принадлежащие к разным группам, способны образовывать пары. Для выявления истинной эпитопной специфичности моноклонов требуется их дальнейшее исследование.

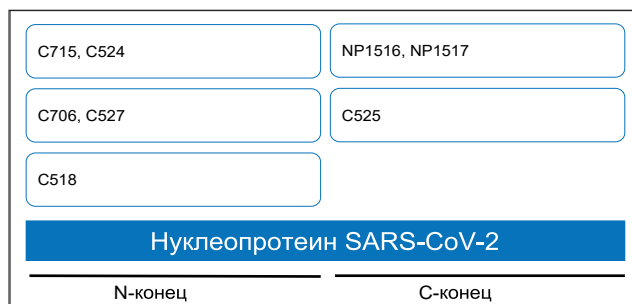


Рис. 3. Предполагаемые эпитопные области антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2. Обратите внимание, что изображение не является истинной иллюстрацией эпитопов или их границ. Оно представляет наше текущее понимание того, как антитела образуют пять эпитопов, три из которых расположены ближе к N-концу, а другие два – к С-концу.

Рекомендованные пары антител

Предварительные рекомендации по парам перечислены в таблицах 3 и 4. Обратите внимание, что это всего лишь предложения, основанные на нашем внутреннем тестировании и отзывах клиентов. Мы продолжаем собирать отзывы клиентов и проводить собственные тестирования, поэтому рекомендации могут быть изменены. Считаем важным брать на тестирование несколько пар, поскольку производительность зависит от многих факторов, включая платформу, буферы, условия анализа и т. д.

Таблица 3. Предварительные рекомендованные пары для сэндвич-иммуноанализов.

Детекторные МоАт конъюгированы с HRP		Детекторные антитела конъюгированы с биотином	
Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
C524	C706	C524	C706
C518	C524	C706	C518
C524	C527	C715	C518
NP1510	NP1517	PSN5	C518
NP1516	C525	PSN5	C524
C715	C706	NP1510	NP1517
C527	C715	C524	C527
		C518	C706
		C524	C518

Таблица 4. Предварительные рекомендации по парам антител для обнаружения нуклеопротеина SARS-CoV-2 в ИХА.

1+1		Улучшенные варианты	
Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
C715	C706	C706	C518+C524
C706	C524	C706	C518+C524+C715
C706	C518	C706+C518	C524
PSN5	C518	C706+C518	C524+C715
PSN5	C524	C518+C524	C706
PSN5	C706	C518+C524+C715	C706
C518	C706	C524+C715	C706+C518
C524	C706	C518+C524+C715	C706+C527
C706	C715	C706+PSN5	C518+C524

Моноклональные антитела, специфичные к Spike RBD SARS-CoV-2.

Мы предоставляем шесть МоАт, специфичных для RBD-области Spike 1. Рекомендации по парам показаны в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Предварительные рекомендации пар для сэндвич-иммуноанализов для обнаружения Spike RBD SARS-CoV-2.

Детекторные МоАт конъюгированы с HRP		Детекторные МоАт конъюгированы с биотином	
Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
RBD5305	RBD1106	RBD1106	RBD5313
RBD4319	RBD1106	RBD1106	RBD5305
RBD5308	RBD5305	RBD5305	RBD1106
RBD5324	RBD5308	RBD1106	RBD4319
		RBD5308	RBD5313
		RBD5308	RBD5305

Таблица 6. Предварительные рекомендации по парам для обнаружения spike RBD SARS-CoV-2 в ИХА.

Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
RBD5308	RBD5324	RBD5324	RBD5308
RBD5308	RBD5313	RBD5313	RBD5308

Клон R107 обладает нейтрализующими свойствами.

Один из моноклонов к Spike RBD, клон R107, продемонстрировал сильные нейтрализующие свойства в анализе нейтрализации вирусов, проведенном в соответствии с тестом, недавно описанным Tan et al. (3). R107 эффективно ингибировал взаимодействие между рекомбинантным RBD и ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) (см. Таблицу 6). Было показано, что это взаимодействие имеет решающее значение для проникновения коронавируса в клетки.

Обратите внимание! Мы не рекомендуем использовать R107 в тестах на антиген COVID-19, поскольку он не позволяет эффективно выявлять южноафриканский вариант. Однако из-за его способности эффективно ингибировать взаимодействие ACE2-RBD его можно использовать в анализах нейтрализации антител в качестве калибратора.

Таблица 7. Эксперимент по нейтрализации вируса с рекомбинантными антигенами ACE2 и spike RBD показал, что клон R107 способен ингибировать взаимодействие между ACE.

Образец	OD	% ингибирования
RBD1106	1.4614	22.8
R107	0.0635	96.6
Пациент с высоким титром нейтрализующих антител	0.2	89.4
Отрицательный контроль	1.9156	-1.2
Отрицательный контроль	1.8689	1.2
Положительный контроль	0.1465	92.3

Антитела к иммуноглобулинам для серологических тестов.

Мы также предлагаем антитела против IgM, IgG и IgA, подходящие для разработки серологических тестов.

Рекомбинантные антигены SARS-CoV-2

Spike RBD представляет собой фрагмент Arg319-Phe541 поверхности гликопротеина spike и содержит рецептор-связывающий домен вируса. Он экспрессируется в клетках млекопитающих, его чистота составляет более 95%. Нуклеопротеин – это полноразмерный нуклеокапсид SARS-CoV-2, экспрессируемый в *E. coli*. Чистота белка более 95%.

Рекомбинантный ACE2

Ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) представляет собой рецептор клеточной мембраны, который, как известно, опосредует проникновение в клетки SARS-CoV-2 после связывания домена RBD вируса с рецептором.

Мы предлагаем рекомбинантный ACE2 (кат. № 8AE5). Белок состоит из внеклеточного домена ACE2 и содержит С-концевую метку Fc. Он связывается с рекомбинантным RBD и может быть использован, например, в тестах нейтрализации вирусов.

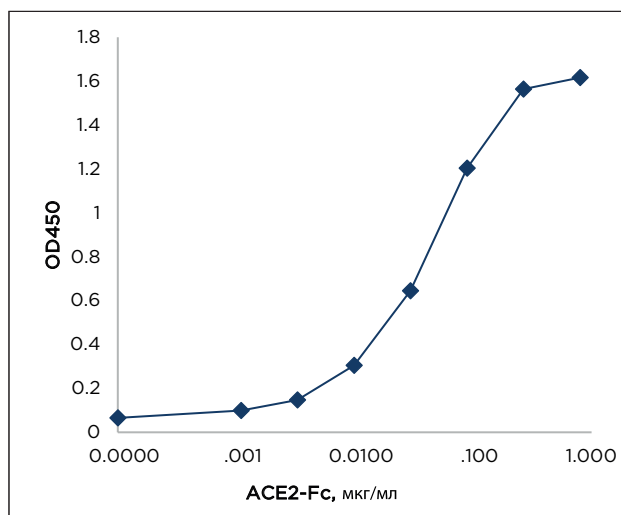


Рисунок 4. Кривая титрования ACE2-Fc показывает связывание с рекомбинантным RBD, нанесенным на лунки микропланшета (1 мкг/лунку).

Информация для заказа

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Изотип	Примечания
SARS-CoV-2 Spike RBD	3CV2	R107	IgG1	In vitro, ИФА, ингибирование связывания ACE2-RBD
		RBD1106	IgG1	ИФА
		RBD4319	IgG1	R&D образец, ИФА, антитело к гетерогбридоме крысы и мыши
		RBD5305	IgG1	R&D образец, ИФА, рекомбинантное химерное антитело
		RBD5308	IgG1	R&D образец, ИФА, рекомбинантное химерное антитело
		RBD5313	IgG1	R&D образец, ИФА, рекомбинантное химерное антитело
		RBD5324	IgG1	R&D образец, ИФА, рекомбинантное химерное антитело
SARS-CoV-2 Нуклеопротеин	3CV4	C706	IgG	ИФА, рекомбинантное кроличье антитело
		C715	IgG	ИФА, рекомбинантное кроличье антитело
		C518	IgG1	In vitro, ИФА
		C524	IgG1	In vitro, ИФА
		C525	IgG1	In vitro, ИФА
		C527	IgG1	In vitro, ИФА
		NP1510	IgG1	ИФА
		NP1516	IgG1	ИФА
Иммуноглобулины A (IgA)	1A1cc	3B7cc	IgG1	In vitro, ИФА, РПГА, Fc-фрагмент
		1H9cc	IgG2b	In vitro, ИФА, РПГА, Fc-фрагмент
Иммуноглобулины G (IgG)	1G1cc	5A9cc	IgG2a	In vitro, ВБ, ИД, Fc-фрагмент, Pan g (Cg 2 домен), нет κ/p с IgA, IgM
		3D3cc	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, ИД, Fc-фрагмент, Pan g (Cg 3 домен), нет κ/p с IgA, IgM
Иммуноглобулины M (IgM)	1M3cc	2B9cc	IgG2b	In vitro, ВБ, ИФА, m-цель, Fc-фрагмент

ПОЛИКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

Название продукта	Кат. №	Животное-хозяин	Примечания
SARS-CoV-2 Поликлональный нуклеопротеин	PSN5	коза	ИФА

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
ACE2-Fc, человеческий, рекомбинантный	8AE5	>95%	Рекомбинантный
SARS-CoV-2 Spike RBD, млекопитающих, рекомбинантный	8COV1	>95%	Рекомбинантный
SARS-CoV-2 Нуклеопротеин, рекомбинантный	8COV3	>95%	Рекомбинантный