

УДК 57.088.1

Разработка иммуноанализа с помощью интерферометрической регистрации его кинетики в реальном времени

А. В. Орлов^{1,2}, А. Г. Буренин^{1,2}, В. О. Шипунова², А. А. Лизунова², Б. Г. Горшков¹,
П. И. Никитин^{1*}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

²Московский физико-технический институт, 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

*E-mail: nikitin@kapella.gpi.ru

Поступила в редакцию 15.05 2013

РЕФЕРАТ Предложен и экспериментально реализован метод для эффективной разработки и оптимизации протоколов твердофазного иммуноанализа на поверхности стекла за счет высокочувствительного количественного мониторинга каждой стадии анализа. Метод основан на использовании принципа спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ), позволяющего измерять в реальном времени толщину слоя, образующегося в результате связывания биомолекул из раствора с распознающими молекулярными рецепторами на поверхности сенсорного чипа. Реализация предложенного метода выполнена с помощью компактных трехканальных СКИ-биосенсоров, использующих в качестве сенсорных чипов стандартные покровные стекла без нанесения дополнительных пленок. Проведено экспериментальное сравнение различных схем иммобилизации антител на стеклянную поверхность, а также оптимизация таких схем для достижения высокой сорбционной емкости сенсорных чипов. Выполнена сравнительная характеристика кинетики каждого этапа иммуноанализа, проведенного с использованием оптимизированных протоколов: ковалентной иммобилизации антител на эпоксилированную поверхность и сорбции на биотинилированную поверхность с помощью высокоаффинной связи биотин–стрептавидин. На примере детекции сердечного тропонина I показано, что применение магнитных наночастиц в качестве меток приводит к дополнительному усилению сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, что позволяет улучшить предел детекции в 100 раз. Разработанные протоколы могут использоваться в сочетании с альтернативными платформами иммуноанализа, в том числе основанными на регистрации лишь конечного результата – количества связавшихся меток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА безметочные биосенсоры, биотинилирование, иммуноанализ, интерферометрия, магнитные наночастицы, сенсорные чипы, сердечный тропонин I, функционализация поверхности, эпоксилирование поверхности, эффективность иммобилизации биомолекул.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АПТЭС – (3-аминопропил)триэтоксисилан; БСА – бычий сывороточный альбумин; ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор; ГОТС – (3-глицидоксипропил)триметоксисилан; ДМФА – диметилформамид; сТнI – сердечный тропонин I; МНЧ – магнитные наночастицы; СКИ – спектрально-корреляционная интерферометрия.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всем мире значительное внимание уделяется исследованиям, посвященным методам определения белковых маркеров заболеваний в сложных биологических жидкостях, например крови, сыворотке, слюне и т.п. Разработка методов иммуноанализа для регистрации таких веществ чрезвычайно важна для клинической [1] и экстренной [2] диагностики, контроля эффективности лечения [3], поиска новых специфических антигенов как маркеров заболеваний [4], разработки лекарственных средств [5–7] и др. Одним из распространенных форматов

иммуноанализа [8], обеспечивающих высокую чувствительность, точность и специфичность, является твердофазный сэндвич-иммуноанализ [9, 10]. В его основе лежит образование на твердой фазе комплекса «иммобилизованное антитело–антиген–детектирующее антитело», образующегося только в присутствии определяемого антигена. Результат регистрируется с помощью меток различной природы (ферментных [11], латексных [12], золотых [13], магнитных [14, 15] и пр.), соединенных с детектирующими антителами, как правило, ковалентно или с помощью высокоаффинной промежуточной

связи, например «антитело–антиген» [16], «биотин–стрептавидин» [17], «барназа–барстар» [18, 19].

Основные характеристики иммуноанализа – предел детекции, линейный и динамический диапазон, чувствительность, специфичность – зависят от выбора антител, способа их иммобилизации на твердую фазу, площади поверхности твердой фазы, времени инкубации и концентрации иммунореагентов, а также состава буферных и стабилизирующих растворов [20]. Влияние каждого из этих параметров можно оценить с помощью меточных методов лишь на завершающей стадии иммуноанализа. Безметочные оптические методы могут значительно повысить эффективность разработки протокола иммуноанализа за счет мониторинга в реальном времени всех этапов биохимических реакций, а также сокращения времени и числа операций. Наиболее распространены методы, использующие дорогостоящие сенсорные чипы с прецизионно напыленными пленками золота [21, 22], оптическими диэлектрическими пленками с регламентированным показателем преломления [23], пористыми кремниевыми структурами с фиксированной глубиной пористости [24] и т.д. В результате многие методы оказываются слишком затратными по сравнению с традиционным иммуноферментным анализом для разнообразных применений, требующих одноразовых расходных материалов.

Ранее авторами были предложены оригинальные методы спектрально-фазовой [25, 26] и спектрально-корреляционной интерферометрии [27–29] для регистрации взаимодействия биомолекул на поверхности плоскопараллельных прозрачных пластин, например недорогих пкровных стекол, как без каких-либо покрытий, так и с нанесением тонких пленок, типичных для поверхностных слоев биосенсорных чипов. Эти методы успешно применяются для количественного определения конформационных изменений полимеров [30], регистрации маркеров заболеваний в сыворотке крови [31], пиретроидов при экологическом мониторинге [32], выявления функциональных механизмов лекарственных препаратов [33].

Целью работы была разработка методики оптимизации сэндвич-иммуноанализов с помощью мониторинга в реальном времени каждой стадии анализа методом спектрально-корреляционной интерферометрии. Для демонстрации возможностей методики проведена оптимизация магнитного иммуноанализа [15, 34, 35], использующего в качестве меток магнитные наночастицы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

Комплекс из субъединиц сердечных тропонинов I, T и C, моноклональные антитела к сердечному тропо-

нину I (клоны 19C7 и 16A11), конъюгаты моноклональных антител к сердечному тропонину I (клоны 19C7 и 16A11) с биотином были любезно предоставлены проф. А.Г. Катрухой (группа иммунохимии МГУ, Москва). В работе также использовали (3-аминопропил)триэтоксисилан, (3-глицидоксипропил)триметоксисилан, N-гидроксисукцинимидный эфир биотина (Sigma Aldrich, США); коммерчески доступные наночастицы (Miltenyi Biotec, Германия) размером ~50 нм, состоящие из нескольких кристаллов оксида железа, покрытых полимерной оболочкой, с которой были ковалентно конъюгированы распознающие биомолекулы: стрептавидин или моноклональные крысиные антимышинные антитела к изотипу IgG1. Остальные реагенты имели квалификацию не ниже «ч.д.а.».

Характеризация магнитных наночастиц (МНЧ)

Микрофотографии МНЧ получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 с ускоряющим напряжением 200 кВ.

Метод спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ)

Метод спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ), подробно описанный в [27–29], использует два интерферометра Фабри–Перо в оригинальной оптической схеме с применением излучения суперлюминесцентных диодов. База первого интерферометра (расстояние между зеркалами) периодически изменяется с помощью пьезоэлектрического преобразователя. Роль второго интерферометра и сенсорного чипа выполняет прозрачная плоскопараллельная пластина, например из стекла или пластика, как без каких-либо пленок, так и с частично прозрачными пленками на поверхности. В данной работе в качестве сенсорного чипа использовали пкровное стекло с иммобилизованными на поверхности рецепторными молекулами. Показано, что такие стекла при толщине около 100 мкм являются приемлемыми интерферометрами Фабри–Перо при условии, что размер каждой отдельной зоны наблюдения составляет 2–8 мм. На таком расстоянии толщина стандартных пкровных стекол варьирует менее чем на четверть длины волны излучения.

Метод СКИ использует интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пкровного стекла, и зондирующим лучом, отраженным от верхней поверхности стекла с биораспознающими молекулами (рис. 1А). В ходе исследуемой биохимической реакции на сенсорном чипе происходит присоединение биомолекул из раствора (лигандов) к рецепторным молекулам, что увеличивает оптический путь зондирующего луча, отраженного от гра-

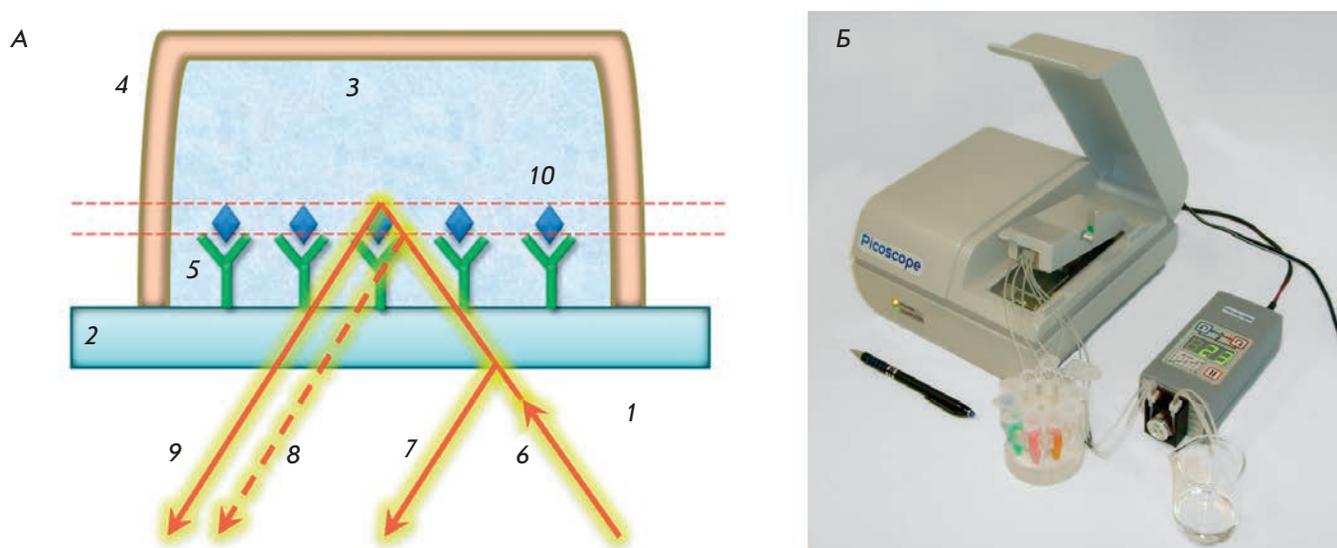


Рис. 1. Принцип ОКИ. Изменение оптической толщины биослоя на поверхности стекла регистрируется по спектру интерферирующих лучей, отраженных от сенсорного чипа (А): 1 – воздух; 2 – покровное микроскопное стекло; 3 – исследуемый раствор; 4 – проточный канал; 5 – рецепторные молекулы; 6 – падающий луч излучения суперлюминесцентного светодиода; 7, 9 – отраженные лучи; 8 – положение отраженного луча до биохимической реакции; 10 – регистрируемые биомолекулы. Б – фотография трехканального биосенсорного прибора Пикоскоп®

ницы «жидкость–биослой». Результат интерференции двух лучей зависит от толщины биологического слоя, изменение которой в ходе реакции вычисляется по изменению фазы корреляционного сигнала при сканировании базы первого интерферометра.

Метод ОКИ реализован в семействе приборов Пикоскоп® (рис. 1Б), которые позволяют регистрировать в реальном времени динамику молекулярных реакций на поверхности покровных стекол с разрешением по глубине в пикометровом диапазоне толщин, усредненных по области наблюдения [28]. В текущей приборной реализации сенсорный чип размещался внутри прибора и накрывался крышкой, имеющей три независимых канала. Каждый из каналов соединен с проточной системой, обеспечивающей проток реагентов по верхней поверхности стекла. Высота канала 0.1 мм, продольные размеры 3.5×1.7 мм. Реагенты пропускали со скоростью 7.5 мкл/мин при комнатной температуре. Оптическая регистрация в каждом канале осуществлялась по спектру интерферирующих лучей, отраженных от нижней поверхности сенсорного чипа, находящегося в центральной области канала площадью 1 мм^2 . Пикоскоп® позволяет использовать сенсорные чипы с предварительно иммобилизованными антителами [28]. В данной работе процесс иммобилизации проходил непосредственно в протоке внутри прибора с целью количественного мониторинга.

Очистка поверхности стекол

Приведенные ниже химические модификации стеклянной поверхности осуществлялись по методикам, разработанным для определения концентрации сердечного тропонина на основе подходов, обсуждавшихся в [32].

С целью очистки и повышения плотности гидроксильных групп на поверхности покровных стекол промывали метанолом, помещали в 30% раствор пероксида водорода и 95% серной кислоты в соотношении 1 : 3 и инкубировали в течение 40 мин при 70°C . После этого промывали 3 раза тридистиллированной водой и 2 раза метанолом. Стекла после очистки немедленно подвергались последующим химическим модификациям.

Аминирование стекол и иммобилизация антител

Аминированные стекла получали следующим образом: очищенные стекла помещали в 3% раствор АПТЭС в метаноле и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, 3 раза промывали в изопропанолу и высушивали. Аминированные стекла до момента использования хранили при комнатной температуре.

Для ковалентной иммобилизации смешивали 5 мкл антител (1 мг/мл), 1 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), 2 мг N-гидроксисукцинимид (NHS) и 35 мкл 10 мМ фос-

фатного буфера (рН 5.0), инкубировали в течение 15 мин, затем добавляли 160 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР), рН 7.4, и пропускали полученный раствор по поверхности аминированных стекол в проточной системе биосенсора Пикоскоп® в течение 10 мин.

Эпоксирование стекол и иммобилизация антител

Прошедшие очистку стекла помещали в 5% раствор ГОТС в метаноле и инкубировали в течение 16 ч при комнатной температуре. Промывали 3 раза изопропанолом и выдерживали в сушильном шкафу 1 ч при 105°C. До использования в экспериментах стекла хранили при комнатной температуре. Иммобилизацию антител проводили непосредственно в проточной системе прибора, пропуская по поверхности стекла раствор целевых антител с концентрацией 25 мкг/мл в ФСБР.

Биотинилирование стекол и иммобилизация антител

Аминированные стекла помещали на 2 ч в раствор, содержащий 10 мМ *N*-гидроксисукцинимидного эфира биотина и 500 мМ триэтиламина в диметилформамиде (ДМФА) при комнатной температуре. После промывки ДМФА и метанолом стекла высушивали и до использования хранили при комнатной температуре. Для иммобилизации антител в проточной системе прибора по поверхности стекла последовательно пропускали растворы стрептавидина в концентрации 25 мкг/мл в ФСБР и целевых биотинилированных антител в такой же концентрации в ФСБР, причем оба процесса контролировались по сенсограмме прироста толщины биомолекул на поверхности.

Карбоксилирование стекол и иммобилизация антител

Аминированные стекла помещали на 2 ч в раствор, содержащий 15 мМ янтарного ангидрида в ДМФА. После тройной промывки ДМФА стекла высушивали и до использования хранили при комнатной температуре. Затем стекла на 15 мин помещали в смесь 10 мМ EDC и 15 мМ NHS в ДМФА. После промывки ДМФА стекла высушивали. Затем в проточной системе прибора осуществляли сорбцию целевых антител в концентрации 25 мкг/мл в ФСБР и контроль их толщины, усредненной по сенсорной поверхности.

Иммуноанализ на тропонин

По биотинилированной поверхности сенсорного чипа последовательно пропускали следующие растворы иммунореагентов в ФСБР, рН 7.4: 1) стрептавидин – 25 мкг/мл, 2) биотинилированные антитела

(клон 19С7) к тропонину – 25 мкг/мл, 3) комплекс из субъединиц сердечных тропонинов I, T и C с добавлением 100 мкг/мл БСА и 0.01% глицина, 4) вторые антитела (клон 16А11) к тропонину – 25 мкг/мл, 5) магнитные частицы с 0.1% БСА. Между иммунореагентами в течение 3 мин пропускали ФСБР для промывки. Иммуноанализ на аминированной, эпоксилированной и карбоксилированной поверхностях сенсорных чипов проводили аналогично, но вместо этапов 1 и 2 пропускали раствор нативных антител (клон 19С7) к тропонину в концентрации 25 мкг/мл. Предел детекции определяли по критерию 2σ как минимальную концентрацию антигена, при которой детектируемый сигнал превышает сигнал отрицательного контроля в отсутствие антигена, по крайней мере на величину двух стандартных отклонений сигналов отрицательного контроля.

Определение наблюдаемой кинетической константы ассоциации

Определение наблюдаемой кинетической константы ассоциации основано на теоретической модели равновесной ассоциации [36], адаптированной к применяемой биосенсорной системе. Значения кинетических констант ассоциации k_a и диссоциации k_d , а также максимального сигнала R_{max} выбирались таким образом, чтобы экспериментально наблюдаемые участки сенсограммы при пропускании аналита в концентрации C наилучшим образом соответствовали аппроксимирующей функции:

$$R_t = Ck_a R_{max} \{1 - \exp[-(Ck_a + k_d)t]\} / (Ck_a + k_d).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объект исследований

В качестве модельного антигена при проведении иммуноанализа был выбран сердечный тропонин I (сТнI) – специфичный маркер инфаркта миокарда [37], который локализуется в сердечной мышце и участвует в регуляции ее сокращения. При повреждении сердечной мышцы тропонин I попадает в кровь [38], и по его содержанию в крови можно отличить острый инфаркт миокарда от заболеваний с аналогичными симптомами. Нормальное содержание данного кардиомаркера в крови здоровых доноров, определенное по 99-му процентилю контрольной группы, несколько отличается у различных производителей тестов и составляет 0.01–0.1 нг/мл [39]. При инфаркте миокарда содержание тропонина начинает повышаться в первые же часы, пиковая концентрация достигается через 24–48 ч и может превышать 1000 нг/мл [40], а через 5–14 дней уровень сТнI возвращается к нормальному [41]. Кроме того,

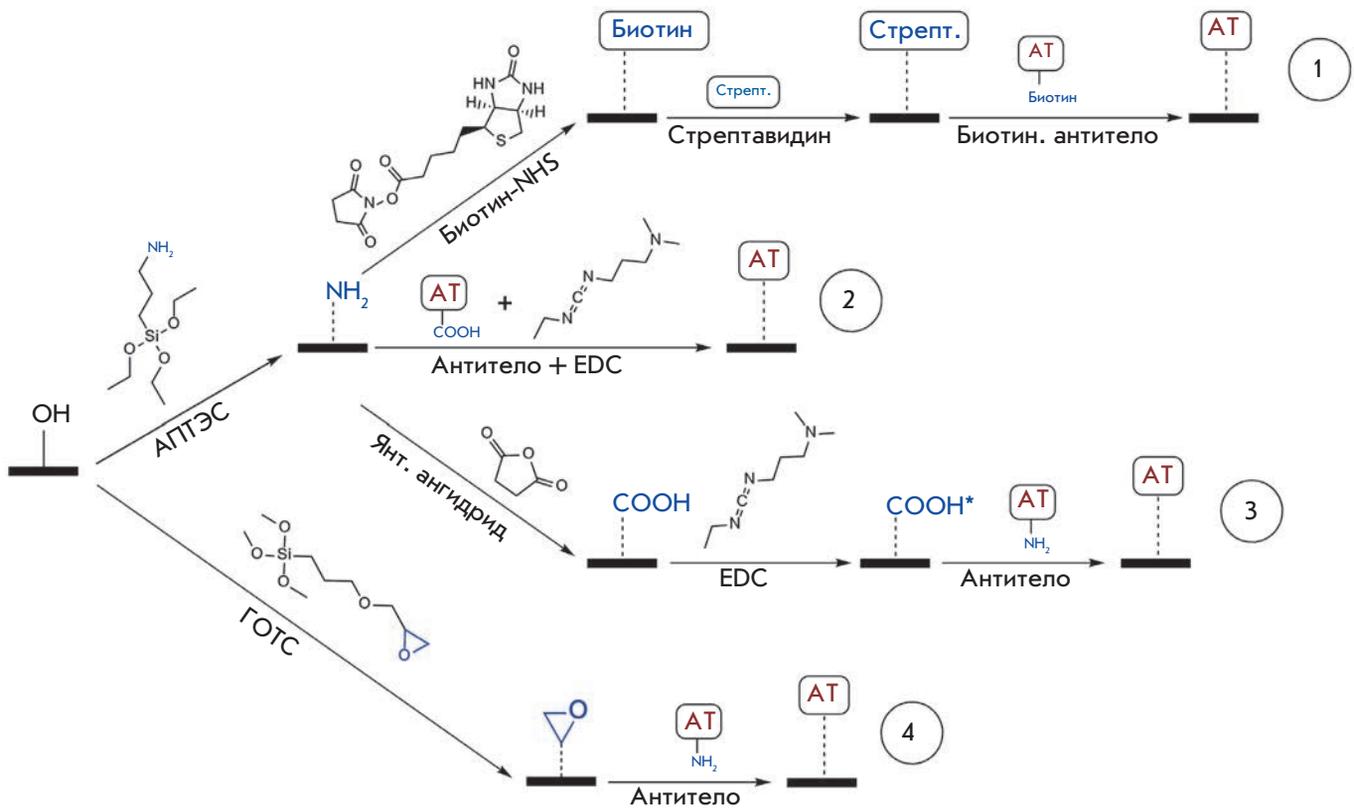


Рис. 2. Схемы иммобилизации антител на стеклянную поверхность: нековалентная сорбция биотинилированных антител на биотинилированную поверхность (1); ковалентная сорбция на аминированную (2), карбоксилированную (3) и эпоксилированную (4) поверхности

по уровню данного маркера можно судить о риске возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у здоровых людей и осложнений в постинфарктный период [42]. В настоящее время разработаны и коммерчески доступны антитела к сТнI, обладающие низкой кросс-реактивностью и высокой специфичностью [43]. На данный момент разработан целый ряд технологий регистрации сТнI [44]. Однако требования к методам детекции данного кардиомаркера крайне высоки, поэтому возникает потребность в новых, более скоростных и чувствительных подходах. В этой связи представляется актуальным создание инструмента для количественного мониторинга в реальном времени всех стадий иммуноанализа, позволяющего ускорить и упростить процедуру разработки новых методов.

Сравнительный анализ различных схем иммобилизации антител

Традиционный метод сэндвич-иммуноанализа состоит из следующих этапов: а) иммобилизация антител на поверхности сенсорного чипа, которая в коммер-

ческих тестах обычно осуществляется предварительно; б) связывание антигена с иммобилизованными антителами; в) распознавание детектирующими антителами другого эпитопа антигена; г) ассоциация меток с детектирующими антителами и детекция меток. Характеристики анализа существенно зависят от поверхностной химии иммобилизации антител на твердую фазу. С помощью биосенсора Пикоскоп® выполнен сравнительный анализ четырех схем функционализации стеклянной поверхности, показанных на рис. 2.

На рис. 3 изображены сенсограммы (зависимости изменения толщины биослоя на сенсорном чипе от времени), полученные на стадии иммобилизации антител для упомянутых схем. Данные сенсограммы позволяют оценить кинетические параметры и интегральную плотность сорбции антител. Видно, что для выбранных условий максимальная скорость иммобилизации и наибольшая плотность сорбции наблюдается при использовании схем 2 и 4, а схема 3 отличается более медленной сорбцией и меньшей плотностью иммобилизации. Данные

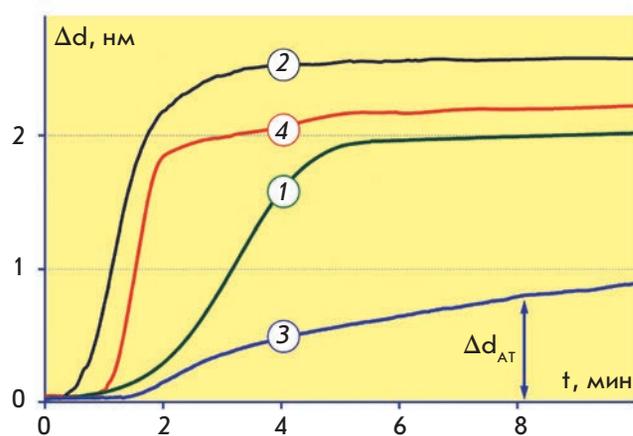


Рис. 3. Сенсограммы при иммобилизации антител на биотинилированную (1), аминированную (2), карбоксилированную (3) и эпоксилированную (4) поверхности

результаты демонстрируют возможность количественного мониторинга в реальном времени процесса иммобилизации антител с помощью предлагаемого подхода. При этом однозначное сравнение выбранных схем выходит за рамки данной работы, поскольку не все условия были предварительно оптимизированы.

Отметим, что интегральная плотность сорбции антител, оцененная по изменению толщины биослоя Δd_{AT} на стадии иммобилизации, может отличаться от плотности биологически активных антител на поверхности твердой фазы, поскольку при сорбции антитела могут терять способность связывать антиген из-за частичной денатурации, стерической недоступности сайтов связывания при неориентированной сорбции и т.д. Так, при использовании схемы 2 может наблюдаться инактивация антител из-за образования перекрестных пептидных связей между различными молекулами после инкубации с карбодимидом. Как показано далее, метод СКИ позволяет количественно оценить потерю активности антител при разных способах иммобилизации путем регистрации связывания с антигеном.

Необходимо отметить, что схемы 2 и 3 требуют предварительной активации карбодимидом поверхности сенсорного чипа или антител. Помимо временных затрат, это может привести к недостаточной воспроизводимости результатов при практическом использовании в условиях, где поддержание стабильности карбодимида затруднено. Из-за эффективности и удобства использования в лабораторных условиях для последующих экспериментов были выбраны схемы 1 и 4.

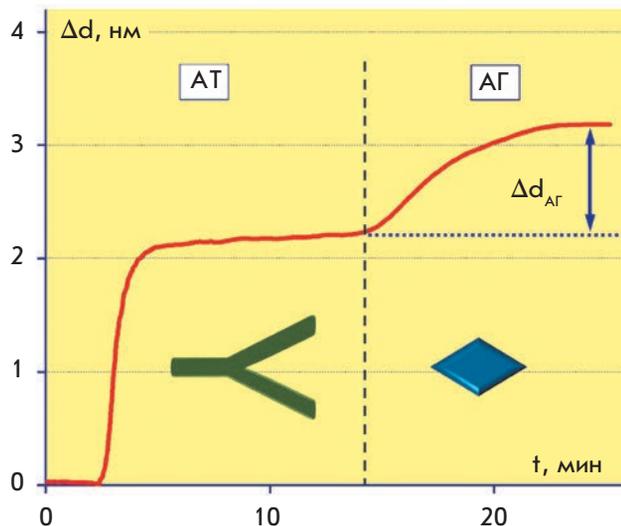


Рис. 4. Сенсограмма безметочной регистрации сердечного тропонина в концентрации 0.5 мкг /мл на эпоксилированной поверхности. Непосредственно перед внесением анализируемого раствора (показано пунктиром) в течение 3 мин с целью промывки пропускали ФСБР

Оптимизация протоколов иммобилизации антител

Оптимизация протоколов иммобилизации антител проводилась для достижения высокой сорбционной емкости сенсорной поверхности, от чего непосредственно зависит чувствительность иммуноанализа. На рис. 4 представлена характерная сенсограмма, демонстрирующая последовательные изменения толщины биослоя, соответствующие иммобилизации антител на эпоксилированной поверхности и связыванию с ними сердечного тропонина из анализируемого раствора, содержащего сТnI в концентрации 0.5 мкг/мл. В течение 3 мин перед внесением анализируемого раствора с целью промывки пропускался ФСБР, что соответствует короткому горизонтальному участку сенсограммы, на котором толщина биослоя практически не менялась.

В качестве критерия оптимизации процесса иммобилизации антител было принято предельное изменение толщины слоя Δd_{AT} , регистрируемое при пропускании раствора антигена в концентрации 1 мкг/мл по поверхности сенсорных чипов, полученных обоими способами. Значение Δd_{AT} пропорционально количеству антигена, связавшегося с антителами, иммобилизованными на поверхности сенсорных чипов, и характеризует плотность биологически активных антител на поверхности твердой фазы – более важному для чувствительности анализа параметру, чем интегральная плотность иммобилизованных антител.

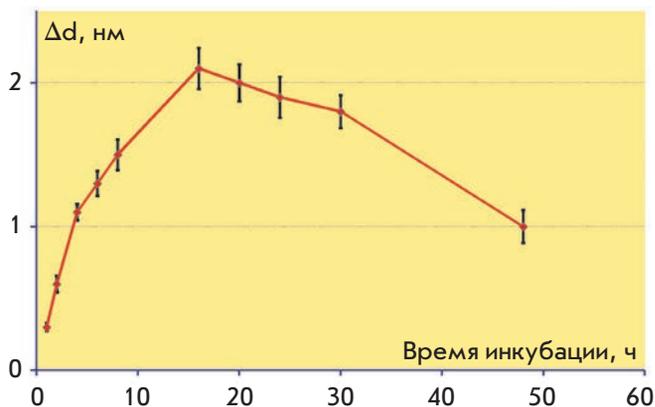


Рис 5. Характерная зависимость сигнала, наблюдаемого при сорбции сердечного тропонина в концентрации 1 мкг/мл на антитела от времени начального эпоксилирования сенсорных чипов в ГОТС при объемной доле воды в растворе 0.1%

Для выбранных схем исследовали зависимость эффективности иммобилизации антител от времени начальной инкубации стекол с модифицирующими поверхность агентами (АПТЭС и ГОТС), а также от объемной доли воды в инкубационном растворе. Последний параметр влияет на соотношение скоростей модификации поверхности, сополимеризации молекул органосиланов в растворе и гидролиза их функциональных групп [45], что определяет эффективность последующей иммобилизации антител: их поверхностную плотность (оптическую толщину) и реакционную способность. Установлено, что максимальный прирост слоя антигена на стадии иммуноанализа достигается при длительности начальной модификации стекол, равной 16 ч, и объемной доле воды – 1% для АПТЭС и 0.1% для ГОТС. В качестве иллюстрации характерная зависимость сигнала от времени инкубации для ГОТС показана на рис. 5. Видно, что максимальная толщина биослоя (и, следовательно, чувствительность биосенсорного анализа) достигается при продолжительности модификации сенсорной поверхности, равной 16 ч. Такое поведение экспериментальной кривой может быть объяснено совместным протеканием двух конкурирующих процессов – иммобилизации органосиланов на поверхность сенсорного чипа и гидролиза эпоксидной группы силана.

Экспериментально показано, что при оптимальных параметрах для эпоксилированной и биотинилированной поверхностей наблюдается практически идентичная плотность иммобилизации антител Δd_{AT} , при том что плотность сорбции антигена c_{TnI} на ан-

титела на эпоксилированной поверхности в ~ 2 раза больше, т.е. в этом случае существенно выше доля активных молекул антител.

Калибровочные кривые в безметочном режиме

Калибровочные кривые в безметочном режиме отражают зависимость детектируемого сигнала Δd_{AG} от концентрации тропонина (рис. 6). При иммобилизации на эпоксилированную и биотинилированную поверхности сенсорных чипов пределы детекции составили соответственно 20 и 30 нг/мл. Различие в пределах детекции при упомянутых схемах иммобилизации антител связано с обсуждавшимся выше экспериментально установленным фактом: плотность иммуоактивных антител на эпоксилированной поверхности в среднем в 2 раза больше. Динамический диапазон составил в обоих случаях около двух порядков величины концентраций, что позволяет регистрировать уровень тропонина вплоть до ~3000 нг/мл. Данный диапазон позволяет определять обширные инфаркты миокарда, но не покрывает всего клинически значимого диапазона в области низких концентраций сердечного тропонина.

Разработанные протоколы иммобилизации антител, а также методы количественной оценки эф-

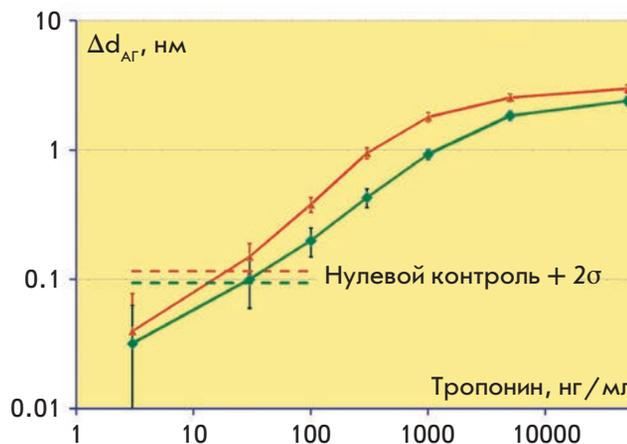


Рис. 6. Калибровочные кривые в логарифмическом масштабе, полученные в безметочном режиме на биотинилированной (нижняя зеленая кривая) и эпоксилированной (верхняя красная кривая) поверхностях сенсорного чипа, отражают зависимость прироста биослоя Δd_{AG} от концентрации сердечного тропонина. Горизонтальные пунктирные линии соответствуют значениям, которые превышают сигнал отрицательного контроля в отсутствие антигена на величину двух стандартных отклонений сигналов отрицательного контроля

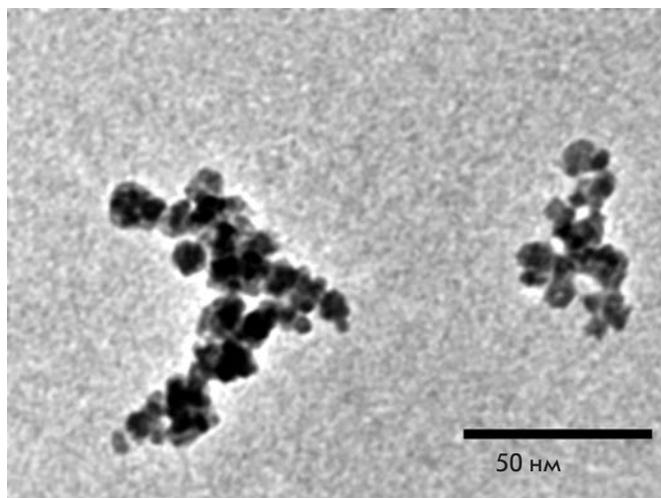


Рис. 7. Микрофотография магнитных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином, полученная методом просвечивающей электронной микроскопии

эффективности иммобилизации могут быть напрямую перенесены на современные биосенсорные платформы, в том числе основанные на детекции окрашенных, ферментных или флуоресцентных меток. Следует отметить, что Пикоскоп® допускает нанесение на покровные стекла широкого набора частично прозрачных пленок (полимерных [30], углеродных и т.д.) или интерфейсных слоев, т.е. регистрировать межмолекулярные взаимодействия как непосредственно на стеклянных, так и на других типах поверхностей, наиболее распространенных в области биосенсорки. Таким образом, возможно упростить разработку широкого спектра различных типов иммуноанализа за счет проведения с помощью Пикоскопа® трудоемких для меточных методов процедур: скрининга антител, выбора буферных растворов, времен инкубаций реагентов и других стадий предварительной оптимизации анализа. Результаты такой оптимизации затем могут использоваться в сочетании с разнообразными методами меточной детекции. Это выгодно отличает метод СКИ от подавляющего большинства других оптических безметочных методов и позволяет использовать его при разработке широкого круга иных биосенсорных систем.

Характеризация и мониторинг в реальном времени связывания магнитных наночастиц

Завершающей стадией иммуноанализа в сэндвич-формате является связывание меток с твердой фазой и их последующая детекция. В данной работе в качестве меток использовались магнитные наночастицы. Применение МНЧ в иммуноанализе позволяет уве-

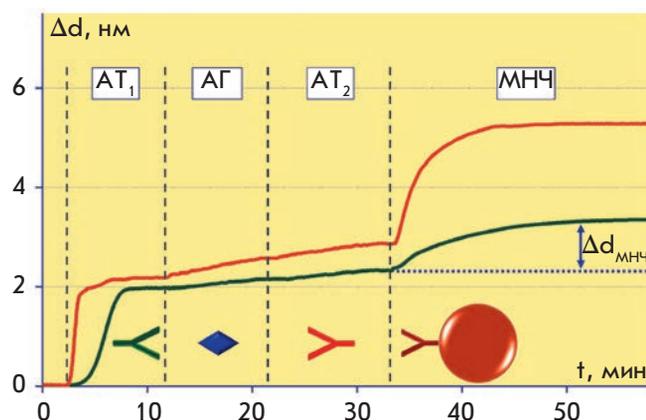


Рис. 8. Сенсограммы, демонстрирующие все шаги магнитного иммуноанализа на биотинилированной (нижняя зеленая кривая) и эпоксилированной (верхняя красная кривая) поверхностях сенсорного чипа: АТ₁ – иммобилизация антител, АГ – связывание антигена (100 нг/мл сТнI) с иммобилизованными антителами, АТ₂ – распознавание детектирующими антителами другого эпитопа антигена, МНЧ – ассоциация магнитных наночастиц с детектирующими антителами. Промывки ФСБР проводились в течение 3 мин перед каждым шагом, указанным пунктиром

личить скорость и чувствительность анализа, проводить детекцию в сложных средах и анализировать пробы большого объема [35]. Полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа типичная микрофотография МНЧ, конъюгированных со стрептавидином, представлена на рис. 7. Из рис. 7 видно, что частицы представляют собой неоднородные по размеру кластеры, состоящие из нескольких наночастиц диаметром ~10 нм, что согласуется и с результатами ряда других исследований подобных частиц [46]. Такие частицы, тем не менее, демонстрируют низкое неспецифическое связывание с компонентами сложных биологических сред, таких, как цельная кровь [47], и обеспечивают высокую воспроизводимость результатов в иммуноанализе при их использовании в качестве детектируемой метки [35].

На рис. 8 показаны сенсограммы, полученные для чипов с эпоксилированной (верхняя кривая) и биотинилированной (нижняя кривая) поверхностями, которые демонстрируют все этапы магнитного сэндвич-иммуноанализа при детекции 100 нг/мл раствора сТнI. Непосредственно перед внесением каждого иммуореагента с целью промывки пропускался ФСБР, что соответствует коротким горизонтальным участкам сенсограммы, на которых толщина биослоя практически не менялась. Для анализа на чипе

Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации для каждого этапа магнитного иммуноанализа в зависимости от типа поверхности

Тип поверхности	Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации, М ⁻¹ с ⁻¹		
	Этап АГ	Этап АТ ₂	Этап МНЧ
Эпоксидированная	$(6.4 \pm 1.3) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^8$
Биотинилированная	$(8.2 \pm 1.9) \times 10^5$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^5$	$(6.4 \pm 1.1) \times 10^7$

с эпоксидированной поверхностью использовались ковалентно иммобилизованные нативные антитела АТ₁, биотинилированные детектирующие антитела АТ₂ и МНЧ, покрытые стрептавидином. Использование таких магнитных частиц в сочетании с сенсорными чипами с биотинилированной поверхностью привело бы к высоким неспецифическим сигналам из-за непосредственного связывания частиц со свободными молекулами биотина. В связи с этим на биотинилированных чипах через стрептавидин иммобилизовывались антитела АТ₁ изотипа IgG2b, в качестве детектирующих применялись антитела АТ₂ изотипа IgG1, а также другой тип магнитных частиц, специфично распознающих этот изотип антител АТ₂.

В сенсограммах, полученных на разных поверхностях при одинаковой концентрации антигена, отличия, проявляющиеся на этапах АГ и АТ₂, становятся еще более существенными на этапе МНЧ. Как видно из рис. 8, скорость связывания МНЧ, конъюгированных со стрептавидином, выше скорости связывания МНЧ, на поверхности которых находятся антитела к изотипу детектирующих антител. Это связано, во-первых, с различной эффективностью сорбции антител на сенсорный чип. Во-вторых, кинетическая константа ассоциации стрептавидаина с биотином на несколько порядков выше, чем у моноклональных антител с антигеном. Это обеспечивает более сильное и быстрое связывание МНЧ, покрытых стрептавидином, по сравнению с МНЧ, покрытыми антителами.

Полученные результаты позволяют оценивать кинетические характеристики взаимодействия биомолекул не только между собой, но и с магнитными частицами. В таблице приведены наблюдаемые кинетические константы ассоциации, оцененные для каждого этапа анализа при помощи сенсограмм, регистрируемых Пикоскопом®. Для обеих схем иммобилизации антител на этапе МНЧ наблюдаемые кинетические константы ассоциации на 2–3 порядка превышают регистрируемые на предыдущих этапах, несмотря на то, что на каждом следующем шаге анализа этот параметр меньше истинного значения из-за диссоциации комплексов, образованных на предыду-

щем шаге. Столь хорошие кинетические характеристики связывания МНЧ по сравнению с молекулами антител и антигенов могут объясняться поливалентностью МНЧ. Несколько биораспознающих молекул, одновременно связанных с одной частицей, могут обеспечивать более высокую вероятность эффективного соударения МНЧ с поверхностью сенсорного чипа.

На рис. 9 представлены зависимости прироста $\Delta d_{\text{МНЧ}}$ биослоя на этапе пропускания магнитных наночастиц от концентрации тропонина. Предел детекции на эпоксидированной поверхности, определенный по критерию 2σ, составил 0.1 нг/мл, что в 10 раз лучше значения 1 нг/мл, полученного на биотини-

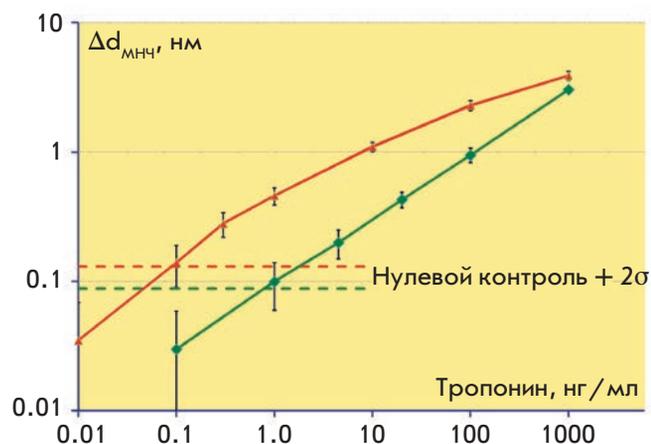


Рис. 9. Калибровочные кривые в логарифмическом масштабе, полученные при регистрации сердечного тропонина на этапе пропускания магнитных наночастиц на биотинилированной (зеленая кривая) и эпоксидированной (красная кривая) поверхностях сенсорного чипа. Горизонтальные пунктирные линии соответствуют значениям, которые превышают сигнал отрицательного контроля в отсутствие антигена на величину двух стандартных отклонений сигналов отрицательного контроля

лированной поверхности. Динамический диапазон в обоих случаях составил около трех порядков величины концентрации. Таким образом, использование МНЧ дает результирующее улучшение предела детекции по сравнению с безметочной детекцией более чем в 100 раз, т.е. реализуется многократная амплификация сигнала. Существенно больший прирост толщины биослоя $\Delta d_{\text{МНЧ}}$ на этапе пропускания магнитных частиц по сравнению с этапами связывания антигена и детектирующих антител во всем диапазоне измеряемых концентраций сТнI объясняется тем, что диаметр частиц существенно больше характерных размеров детектируемых биомолекул. Достигнутый предел детекции сердечного тропонина на уровне 0.1 нг/мл соответствует клинически значимому порогу, необходимому для диагностики инфаркта миокарда [48]. Благодаря высокой чувствительности и широкому динамическому диапазону, разработанный биосенсор можно рассматривать в качестве привлекательного инструмента с доступными расходными материалами (одноразовыми сенсорными чипами) для проведения иммуноанализа в реальном времени в таких областях, как диагностика заболеваний, регистрация патогенов в продуктах питания, мониторинг окружающей среды. Дальнейшие исследования будут посвящены оценке эффективности выявления сТнI в реальных биопробах и подтверждению корреляции получаемых результатов с данными традиционных методов.

Помимо диагностической значимости разработанного метода иммуноанализа, достигнутой благодаря усилению СКИ-сигнала, полученные результаты могут представлять особый интерес для изучения и кинетической характеристики взаимодействия наночастиц с молекулами. Отметим, что в настоящее время наиболее распространенными безметочными биосенсорами, позволяющими определять кинетические параметры наночастиц, являются системы на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [21, 36]. Такие биосенсоры позволяют изучать взаимодействие частиц с биомолекулами, иммобилизованными на модифицированной поверхности хорошо проводящих пленок золота или серебра. При этом используется интерфейсная поверхностная химия, значительно отличающаяся от применяемой в наиболее массовых методах твердофазного иммуноанализа, что затрудняет перенос на другие платформы результатов, полученных с помощью ППР-биосенсоров. Применение же СКИ-метода и дешевых расходных сенсорных чипов существенно расширяет исследовательские возможности для разработки разнообразных способов иммуноанализа. Предложенные в настоящей работе методы оптимизации иммуноанализа позволяют перенести все протоколы на маркерные

биосенсорные платформы, например, использующие высокочувствительные методы детекции МНЧ с помощью компактных электронных устройств [15], основанных на смешении частот [49] при нелинейном перемагничивании частиц [34].

Отдельного исследования заслуживает зависимость эффективности амплификации сигналов от размера МНЧ. С одной стороны, магнитные частицы большего размера (вплоть до нескольких микрометров) могут сильнее увеличить сигнал. Однако более крупные частицы подвержены седиментации под действием силы тяжести, что вызовет появление высокого неспецифического сигнала. В данной работе при использовании МНЧ размером 50 нм не было обнаружено седиментации и неспецифического взаимодействия частиц с поверхностью, поэтому использование более мелких наночастиц не целесообразно.

Отсутствие неспецифической сорбции при амплификации сигнала открывает возможности дальнейшего увеличения чувствительности за счет нескольких шагов амплификации. Так, если после МНЧ, конъюгированных со стрептавидином, пропустить биотинилированный белок с несколькими сайтами биотинилирования, а затем снова частицы, и повторить эту процедуру несколько раз, то возможно значительное увеличение количества меток, а значит, и чувствительности.

Помимо низкого неспецифического связывания МНЧ обладают уникальными свойствами, которые могут быть использованы при дальнейшем развитии предложенных методик. Так, сочетание магнитных свойств с возможностью оптической детекции позволяет реализовать оптомагнитный иммуноанализ [50]. При таком анализе с помощью магнитных частиц можно значительно увеличивать скорость иммунохимических реакций путем магнитного перемешивания, вращения цепочек МНЧ магнитным полем, осуществлять обогащение пробы антигеном за счет магнитной сепарации и снижать неспецифическое связывание меток с поверхностью посредством удаления слабосвязанных частиц магнитным полем соответствующей пространственной конфигурации для «магнитной» отмывки меток.

ВЫВОДЫ

Разработан метод оптимизации магнитного иммуноанализа на стеклянной поверхности, позволяющий регистрировать каждую стадию анализа в реальном времени и использовать в качестве расходных сенсорных чипов недорогие покровные стекла без нанесения каких-либо пленок. Испытаны четыре схемы иммобилизации антител, проведена их оптимизация, оценена эффективность, в результате чего достигнуты высокие значения сорбционной емкости и доли ак-

тивных антител на поверхности сенсорного чипа. Показана возможность регистрации в реальном времени кинетики взаимодействия магнитных наночастиц с биомолекулами. Продемонстрировано, что использование магнитных наночастиц вызывает амплификацию сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, что приводит к дополнительному улучшению предела детекции сердечного тропонина более чем в 100 раз. Таким образом, разработанные интерферометрические биосенсорные системы могут рассматриваться как эффективные инструменты для проведения анализа, а также для широкого круга приложений в таких областях, как разработка и оптимизация методов иммуноанализа, оценка качества иммунореагентов, контроль сорбционных свойств поверхности. Полученные результаты по выбору схемы и оптимизации протоколов иммобилизации антител, мониторингу в реальном времени всех этапов иммуноанализа, кинетической характеристики наночастиц могут быть напрямую перенесены на другие биосенсорные платформы, в том числе с использованием различных меток – магнитных, флуоресцентных, ферментных и др. Развита биосенсорная методика представляется экономич-

чески оправданной альтернативой для проведения иммуноанализа с однократно используемыми расходными материалами для диагностики заболеваний, регистрации патогенов в продуктах питания и мониторинга окружающей среды. ●

Авторы благодарят проф. А.Г. Катруху из МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва) за предоставленные иммунореагенты.

Работа поддержана РФФИ (гранты №10-02-01185, 11-02-01440, 11-04-12181-офи-м 2011, 13-02-01260, 13-03-12468). Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (государственный контракт №16.512.11.2124) с привлечением оборудования Центра коллективного пользования уникальным оборудованием в области нанотехнологий МФТИ (ЦКП МФТИ) при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vaidya V.S., Bonventre J.V. Biomarkers: In Medicine, Drug Discovery, and Environmental Health. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. 640 p.
- Yanga Zh., Zhou D.M. // Clin. Biochem. 2006. V. 39. № 8. P. 771–780.
- Mayeux R. // NeuroRx. 2004. V. 1. № 2. P. 182–188.
- Lundblad R.L. Development and Application of Biomarkers. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011. 297 p.
- Frank R., Hargreaves R. // Nat. Rev. Drug. Discov. 2003. V. 2. P. 566–580.
- Lee J.M., Han J.J., Altwirger G., Kohn E.C. // J. Proteomics. 2011. V. 74. № 12. P. 2632–2641.
- Bleavins M.R., Carini C., Jurima-Romet M., Rahbari R. Biomarkers in Drug Development: A Handbook of Practice, Application, and Strategy. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. 760 p.
- Yalow R.S., Berson S.A. // Nature. 1959. V. 184. P. 1648–1649.
- Uotila M., Ruoslathi E., Envall E. // J. Immunol. Meth. 1981. V. 42. P. 11–15.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. / Проблемы аналитической химии. Биохимические методы анализа // Под ред. Дзантиева Б.Б. М.: Наука, 2010. Т. 12. С. 297–326.
- Engvall E., Perlmann P. // Immunochemistry. 1971. V. 8. P. 871–874.
- Plotz C.M., Singer J.M. // Am. J. Med. 1956. V. 21. № 6. P. 888–892.
- Leuvering J.H.W., Thal P.J.H.M., van der Waart M., Shuurs A.H.W.M. // J. Immunol. Meth. 1981. V. 45. P. 183–194.
- Laborde R., O'Farrell B. // IVD Technology. 2002. April issue. P. 36.
- Nikitin P.I., Vetoshko P.M., Ksenevich T.I. // Sens. Lett. 2007. V. 5. № 1. P. 296–299.
- Rosi N.L., Mirkin C.A. // Chem. Rev. 2005. V. 105. № 4. P. 1547–1562.
- Lei J., Ju. H. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2122–2134.
- Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // ACS Nano. 2013. V. 7. № 2. P. 950–961.
- Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.
- David W. The Immunoassay Handbook. Oxford: Elsevier Ltd., 2005. P. 103–135.
- Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. // Biosens. Bioelectron. 1995. V. 10. № 8. P. I–IX.
- Cunningham B.T. Label-free optical biosensors: An introduction. In: Cooper M.A. Label-Free Biosensors: Techniques and Applications. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. P. 1–28.
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W. // Sens. Act. B. 1993. V. 11. P. 21–27.
- Dancil K.S., Greiner D.P., Sailor M.J. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 7925–7930.
- Никитин П.И., Горшков Б.Г., Валейко М.В., Погов С.И. // Квантовая электроника. 2000. Т. 30. № 12. С. 1099–1104.
- Nikitin P., Gorshkov B., Valeiko M., Nikitin S. // Proc. SPIE. 2001. V. 4578. P. 126–135.
- Nikitin P.I., Valeiko M.V., Gorshkov B.G. // Sens. Act. B. 2003. V. 90. P. 46–51.
- Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I. // Sens. Act. B. 2005. V. 111–112. P. 500–504.
- Nikitin P.I., Svetoch I.E., Nikitin M.P., Ksenevich T.I., Gorshkov B.G., Konov V.I., Aksinin V.I. // Proc. SPIE. 2007. V. 6733. P. 67331M.
- Ivanov A.E., Solodukhina N., Wahlgren M., Nilsson L., Vikhrov A.A., Nikitin M.P., Orlov A.V., Nikitin P.I., Kuzimenkova M.V., Zubov V.P. // Macromol. Biosci. 2011. V. 11. № 2. P. 275–284.
- Дирюгина Е.Г., Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Никитин П.И. // Труды МФТИ. 2012. Т. 4. № 3. С. 11–17.

32. Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Кseneвич Т.И., Никитин П.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 3. С. 312–318.
33. Arefieva T.I., Krasnikova T.L., Potekhina A.V., Ruleva N.U., Nikitin P.I., Ksenevich T.I., Gorshkov B.G., Sidorova M.V., Beshpalova Zh.D., Kukhtina N.B., Provatorov S.I., Noeva E.A., Chazov E.I. // *Inflammation Res.* 2011. V. 60. № 10. P. 955–964.
34. Nikitin P.I., Vetoshko P.M., Ksenevich T.I. // *J. Magn. Magn. Mater.* 2007. V. 311. P. 445–449.
35. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin E.V., Nikitin P.I. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 2. P. 1154–1163.
36. Appendix C. Predefined models. In: *BIAevaluation 3.0 Software Handbook*. Biacore AB, 1997. P. C-2–C-33.
37. Adams J.E., Bodor G.S., Davila-Roman V.G., Delmez J.A., Apple F.S., Ladenson J.H., Jaffe A.S. // *Circulation.* 1993. V. 88. № 1. P. 101–106.
38. Katrukha A.G., Bereznikova A.V., Esakova T.V., Pettersson K., Lovgren T., Severina M.E., Pulkki K., Vuopio-Pulkki L.M., Gusev N.B. // *Clin. Chem.* 1997. V. 43. № 8. P. 1379–1385.
39. Thygesen K., Mair J., Giannitsis E., Mueller C., Lindahl B., Blankenberg S., Huber K., Plebani M., Biasucci L.M., Tubaro M., et al. // *Eur. Heart J.* 2012. V. 33. № 18. P. 2252–2257.
40. Peri G., Inrona M., Corradi D., Iacuitti G., Signorini S., Avanzini F., Pizzetti F., Maggioni A.P., Moccetti T., Metra M., et al. // *Circulation.* 2000. V. 102. P. 636–641.
41. NICE clinical guideline 95. Chest pain of recent onset. Assessment and diagnosis of recent onset chest pain or discomfort of suspected cardiac origin. 2010.
42. Morrow D.A., Cannon C.P., Jesse R.L., Newby L.K., Ravkilde J., Sorrow A.B., Wu A.H.B., Christenson R.H. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 552–574.
43. Katrukha A.G. Antibody selection strategies in cardiac troponin assays. In: Wu A.H.B. *Cardiac Markers*. 2nd Ed. New York: Humana Press, 2003. P. 137–185.
44. Lemos J.A. // *JAMA.* 2013. V. 309. № 21. P. 2262–2269.
45. Silane Coupling Agents. Chapter 13. In: Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*. 2nd Ed. London: Acad. Press, 2008. P. 565–567.
46. Schreiber S., Savla M., Pelekhov D.V., Iscru D.F., Selcu C., Hammel P.C., Agarwal G. // *Small.* 2008. V. 4. № 2. P. 270–278.
47. Martin V.M., Siewert C., Scharl A., Harms T., Heinze R., Ohl S., Radbruch A., Miltenyi S., Schmitz J. // *Exp. Hematol.* 1998. V. 26. P. 252–264.
48. Bingisser R., Cairns C., Christ M., Hausfater P., Lindahl B., Mair J., Panteghini M., Price C., Venge P. // *Am. J. Emergency Med.* 2012. V. 30. P. 1639–1649.
49. Григоренко А.Н., Никитин П.И., Рощепкин Г.В. // *ЖЭТФ.* 1997. Т. 112. № 8. С. 628–642.
50. Nikitin P., Ksenevich T., Nikitin M., Gorshkov B. // *Proceedings of Ninth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. EUROPT(R)ODE IX.* Dublin, 2008. P. OA4.2.