

Оригинальные статьи

Научная статья

УДК 538.95

<https://doi.org/10.17308/kcmf.2021.23/3312>

Синтез и экспериментальное исследование жидких дисперсий магнитных флуоресцентных полистирольных микросфер

П. В. Шалаев^{1,2,3} ✉, Е. В. Бондина^{2,3}, Н. Н. Санькова^{4,5}, Е. В. Пархомчук^{4,5}, С. А. Долгушин^{1,3}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, ул. Гамалеи, 18, Москва 123098, Российская Федерация

²Национальный исследовательский университет «МИЭТ», пл. Шокина, 1, Зеленоград, Москва 1124498, Российская Федерация

³ООО «Айвок», проезд 4922, д. 4, стр. 5, Зеленоград, Москва 124498, Российская Федерация

⁴Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090, Российская Федерация

⁵Институт катализа им. Г. К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, пр. Академика Лаврентьева, 5, Новосибирск 630090, Российская Федерация

Аннотация

Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ на основе микросфер является надёжным, точным и высокочувствительным методом обнаружения различных биомолекул. Однако в настоящее время широкому применению метода в клинической практике препятствует высокая стоимость реагентов для анализа – магнитных спектрально-кодированных микросфер. Поэтому актуальной задачей является разработка новых методик синтеза микросфер, обладающих необходимыми свойствами. Цель работы заключалась в создании новых магнитных флуоресцентных микросфер, пригодных для использования в мультиплексном иммуноанализе.

Были синтезированы образцы магнитных флуоресцентных полистирольных микросфер методами дисперсионной полимеризации и двухстадийного набухания. Проведены экспериментальные исследования геометрических параметров, флуоресценции, магнитных свойств синтезированных микросфер.

Результаты проведенных исследований показали, что перспективными для применения в иммунофлуоресцентном анализе являются микросферы, синтезированные методом дисперсионной полимеризации. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых диагностических мультиплексных тест-систем на основе спектрально-кодированных микросфер.

Ключевые слова: иммунофлуоресцентный анализ, планарный иммуноанализ, микросферы, флуоресценция, дисперсионная полимеризация, двухстадийное набухание

Благодарности: исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-03-2020-216 от 27.12.2019 г.). Авторы выражают благодарность к. х. н. В. С. Семейкиной (Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН) за помощь в проведении стадии набухания образца №2 и его последующей полимеризации.

Для цитирования: Шалаев П. В., Бондина Е. В., Санькова Н. Н., Пархомчук Е. В., Долгушин С. А. Синтез и экспериментальное исследование жидких дисперсий магнитных флуоресцентных полистирольных микросфер. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2021;23(1): 108–121. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2021.23/3312>

✉ Шалаев Павел Владимирович, e-mail: shalaev.pv@gmail.com

© Шалаев П. В., Бондина Е. В., Санькова Н. Н., Пархомчук Е. В., Долгушин С. А., 2021



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.

For citation: Shalaev P. V., Bondina E. V., Sankova N. N., Parkhomchuk E. V., Dolgushin S. A. Synthesis and experimental study of liquid dispersions of magnetic fluorescent polystyrene microspheres. *Kondensirovannye sredy i mezhfaznye granitsy* = Condensed Matter and Interphases. 2021;23(1): 108–121. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2021.23/3312>

1. Введение

В настоящее время флуоресцентные микросферы получили широкое распространение в различных методах иммуноанализа. Иммунофлуоресцентный анализ на основе микросфер имеет ряд таких важных преимуществ, как возможность одновременного обнаружения нескольких аналитов в одном образце (мультиплексность), малый объем пробы, необходимый для анализа, а также высокие точность и чувствительность при высокой скорости проведения анализа.

Методы мультиплексного анализа на основе микросфер широко применяются в научных исследованиях, в медицине, биологии, иммунологии. Данные методы используются для детектирования нуклеиновых кислот [1], обнаружения канцерогенов и токсинов в пищевых продуктах [2, 3], обнаружения фосфорорганических пестицидов, вызывающих загрязнение окружающей среды [4], для диагностики онкомаркеров [5, 6] и различных инфекций [7], в том числе и для выявления коронавирусной инфекции COVID-19 [8].

Мультиплексность в современных методах анализа, как правило, достигается за счёт применения спектрально-кодированных микросфер [9]. Спектральное кодирование микросфер используется для создания разных типов микросфер, которым будут соответствовать исследуемые аналиты, и осуществляется путём окрашивания микросфер различными флуоресцент-

ными красителями в разной концентрации. Так, например, использование комбинации из трёх красителей в разных концентрациях позволяет закодировать до 500 типов микросфер [10].

В основе большинства методов мультиплексного иммуноанализа лежит специфическая реакция антиген-антитело. Формирование иммунокомплексов происходит на поверхности оптически кодированных полимерных микросфер. Например, так называемый «сэндвич»-метод подразумевает формирование иммунокомплексов «первичное антитело – детектируемый антиген – детектирующее антитело – флуоресцентная метка» на поверхности микросфер (рис. 1).

Считывание сигналов флуоресценции для идентификации микросфер и детектирования флуоресцентной метки в ходе мультиплексного иммуноанализа может осуществляться разными методами.

Широко используется подход на основе проточной цитометрии, в котором частицы анализируются в потоке поштучно [11]. В проточной ячейке частицы облучаются лазерным излучением, сигналы светорассеяния и флуоресценции от каждой частицы регистрируются при помощи детекторов на основе фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) или лавинных фотодиодов (ЛФД).

В последние годы на смену проточной цитометрии приходит новый метод – планарный

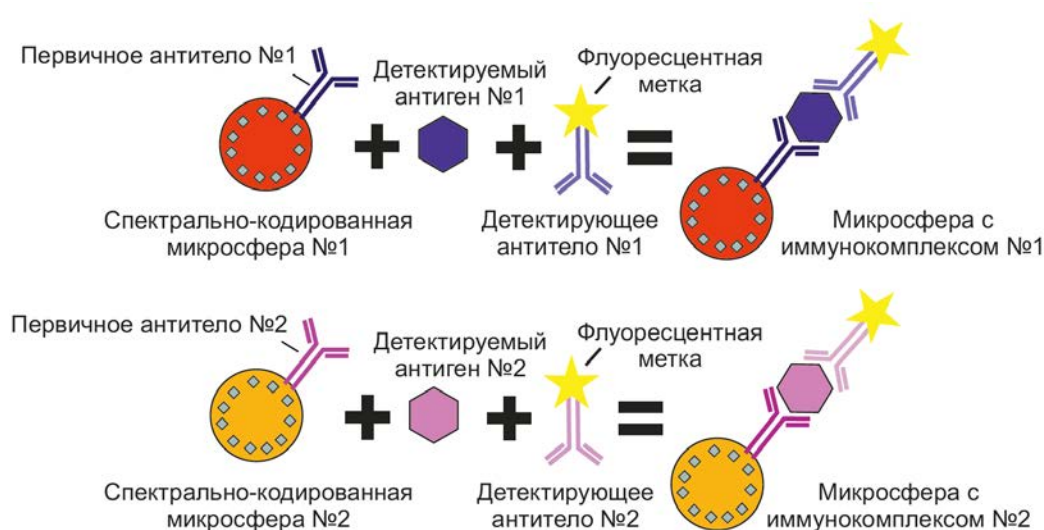


Рис. 1. Формирование иммунокомплексов на поверхности микросфер в методе мультиплексного иммуноанализа

иммуноанализ на основе флуоресцентных магнитных микросфер [12]. В данном методе частицы иммобилизуются в одной плоскости при помощи магнита, после чего осуществляется возбуждение флуоресценции при помощи светодиодов и регистрация при помощи ПЗС (прибор с зарядовой связью) либо КМОП-камеры с использованием необходимых светофильтров (рис. 2).

Анализ полученных изображений в разных каналах флуоресценции позволяет идентифицировать спектрально-кодированные микросферы. После идентификации микросфер таким же образом регистрируется сигнал от флуоресцентной метки с помощью соответствующего фильтра. При этом наличие или отсутствие флуоресценции от определенного типа микросферы указывает на наличие или отсутствие соответствующего аналита в образце. Кроме того, значение интенсивности флуоресценции может быть использовано для оценки концентрации аналита в образце, поскольку интенсивность флуоресценции зависит от количества аналита, связавшегося с микросферой [13].

Приборы, основанные на методе планарного иммуноанализа, являются более доступными, компактными и надежными по сравнению с анализаторами на основе проточной цитометрии [14].

Мультиплексный анализ на основе магнитных спектрально-кодированных микросфер является надёжным, точным и высокочувствительным методом [15]. Однако в настоящее время широкому применению метода в клинической практике препятствует высокая стоимость реагентов для анализа – магнитных спектрально-кодированных микросфер, обусловленная в первую очередь закрытой технологией.

Целью данной работы являлось создание новых магнитных флуоресцентных микросфер, пригодных для использования в мультиплексном иммуноанализе.

В рамках данной работы были синтезированы образцы магнитных флуоресцентных полистирольных микросфер методами дисперсионной полимеризации и двухстадийного набухания. Проведены экспериментальные исследования геометрических параметров, флуоресценции, магнитных свойств с целью оценки возможности и перспективы применения синтезированных микросфер в мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе.

2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы

Для синтеза микросфер использовались следующие реактивы: стирол, «ч.», Россия (очищен вакуумной перегонкой с предварительным удалением ингибитора водным раствором NaOH); метилметакрилат, содержащий 10–110 ppm 4-метоксифенола в качестве ингибитора (99 %, ACROS Organics); дивинилбензол (80 % смесь изомеров, Aldrich), 2-этоксиэтанол, «ч.д.а.», Россия; тетрагидофуран, «ч.», Китай; этанол, 95 %; толуол, «ч.д.а.», «Реахим»; плуроник F-127, Sigma, BioReagent, ККМ = 950–1000 ppm; азо-бис-изобутиронитрил (АИБН), «х.ч.», Россия; лаурилсульфат натрия, «ч.д.а.», «Реахим»; ацетон, «ч.д.а.», Россия; поливинилпирролидон (мол. масса – 40000 г/моль) «Sigma-Aldrich»; магнитная жидкость в керосине представлена компанией ООО «Нанокompозит», средний радиус частиц 9 нм, частицы стабилизированы олеиновой кислотой; вода деионизованная, 13–15 МОм см.

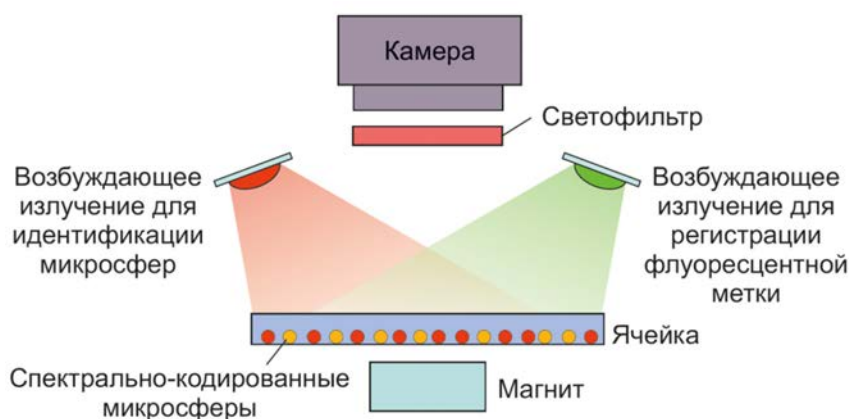


Рис. 2. Планарный иммуноанализ на основе флуоресцентных магнитных микросфер

2.2. Синтез микросфер

Синтез полимерных частиц основан на методе дисперсионной полимеризации (образец №1) [16–18] и методе двухстадийного набухания (образец № 2) [19, 20]. Основное требование к полимерным частицам исходит из использования «жестких» растворителей (например, толуола, тетрагидофурана) на стадии введения магнитных частиц и окрашивания флуоресцентными красителями. Таким образом, частицы должны обладать высокой плотностью сшивки во избежание их растворения и чрезмерного набухания.

2.2.1. Синтез образца № 1 методом дисперсионной полимеризации

Синтез проводился в термостатируемом при температуре 74 °С реакторе, снабженном роторной мешалкой, обратным холодильником, воронкой для подачи реагентов и капилляром для продувания азотом. Число оборотов мешалки составляло 150 об/мин. В качестве реакционной среды использовали этанол. Отдельно на магнитной мешалке смешивали: 15 мл стирола и 0.41 г АИБН, 0.85 мл дивинилбензола-80 в 10 мл 2-этоксиэтанола вводили через 10 мин после начала инициации. СЭМ полученных частиц представлена на рис. 3а.

2.2.2. Синтез образца № 2 методом двухстадийного набухания

Сначала 1 г исходных полимерных частиц, предварительно полученных методом дисперсионной полимеризации (рис. 4а), с молекулярной массой порядка 10 000 Да диспергировали в 50 мл водного раствора лаурилсульфата натрия (0.25 вес. %) с помощью ультразвуковой ванны в течение 30 мин. Затем к раствору при-

бавляли эмульсию, содержащую 10 мл ацетона в 50 мл 0.25 вес. % раствора лаурилсульфата натрия, и оставляли перемешиваться на 12 часов при температуре 25 °С для проведения первой стадии набухания.

На следующей стадии к полученной смеси прибавляли эмульсию мономера, состоящую из 1 мл стирола, 1 мл метилметакрилата, 2 мл сшивающего агента (дивинилбензола-80) с растворенным инициатором (АИБН, 1–2 вес. % по отношению к мономерам) в 50 мл 0.25 вес. % раствора лаурилсульфата натрия, и оставляли для второй стадии набухания на 8–12 часов.

Для проведения полимеризации в реакционную смесь добавляли 50 мл 1 вес. % раствора стабилизатора поливинилпирролидона-40, температуру смеси поднимали до 70 °С и выдерживали в течение 10-ти часов. Полученную суспензию промывали водой (3 раза) и этиловым спиртом (3 раза) для удаления непрореагировавшего мономера и мелких побочных частиц. СЭМ частиц после двухстадийного набухания представлена на рис. 4а.

2.3. Методика введения магнитных частиц в полимерные микросферы

Полимерные частицы центрифугировали в этаноле три раза по 20 мин при относительном центробежном ускорении 907 g в случае образца № 1, и при 403 g в случае образца № 2, на центрифуге ThermoFisher Heraeus Labofuge 200, после чего их переводили в бутанол-1 и центрифугировали в бутаноле еще три раза при тех же параметрах центрифугирования. Затем, по каплям, добавляли магнитную жидкость в толуоле, при воздействии ультразвука на сосуд объемом 5 мл в УЗ ванне VGT-1613QTD объемом 1.3 л

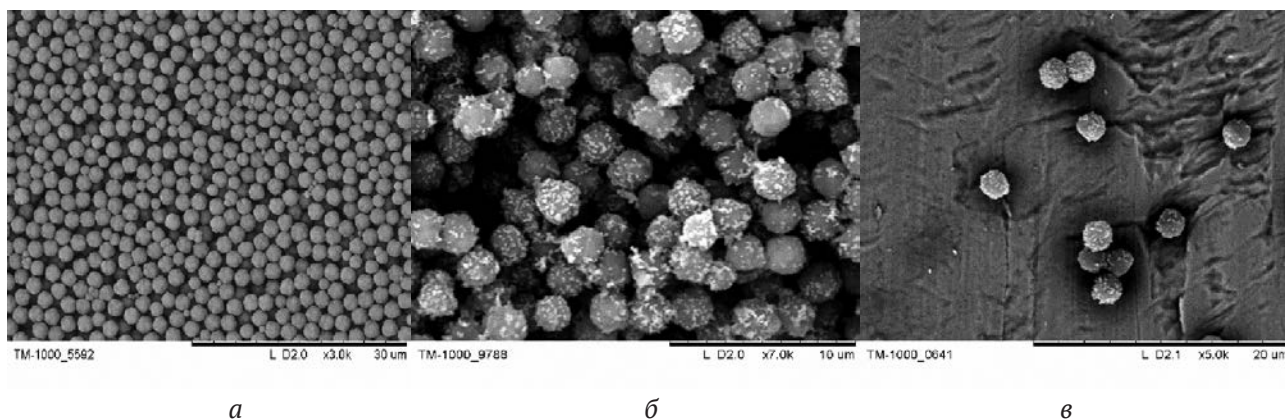


Рис. 3. Снимки СЭМ: а) исходного образца № 1 полученного методом дисперсионной полимеризации; б) образца № 1 после нанесения магнитных частиц; в) образца №1 после нанесения красителя и магнитных частиц

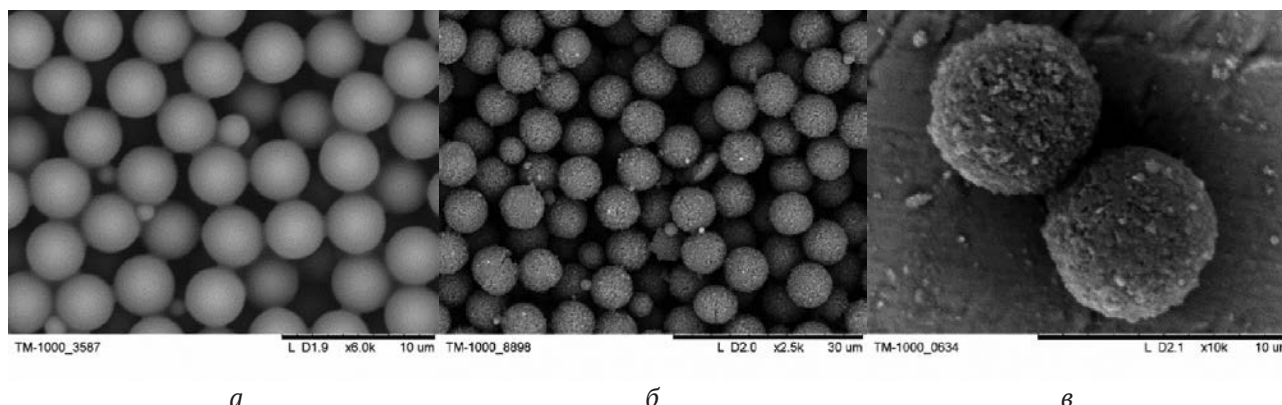


Рис. 4. Снимки СЭМ: а) исходного образца №2; б) образца №2 после двухстадийного набухания; в) образца №2 после нанесения красителя и магнитных частиц

с рабочей частотой ультразвуковых колебаний 40 кГц. Частицы подвергали ультразвуковой обработке не менее двух часов, после чего их отделяли центрифугированием три раза по 20 мин при 45 g от магнитных частиц, не закрепившихся на сферах. Частицы многократно промывали этанолом и водой, отделяя их постоянными магнитами (Nd–Fe–B) с силами на отрыв: 2.35, 8.62, 20.65 кг, выделяя при этом среднюю фракцию частиц. Для последующего окрашивания частиц их переводили в деионизованную воду, содержащую 0.5 мас. % плуроник F-127.

2.4. Методика введения красителей в полимерные микросферы

Цианиновые флуоресцентные красители Су5 и Су5.5 (рис. 5) вводили в частицы диффузионным методом [21]. Красители растворяли в среде тетрагидрофурана и по каплям добавляли к известному количеству полимерных магнитных частиц, диспергированных в деионизованной воде, содержащей 0.5 мас. % плуроник F-127.

Красители оставляли диффундировать в полимерные сферы при 40 °С в течение 6-ти часов при постоянном перемешивании на шейкере УТ-4331S. Сферы отделяли магнитом и промывали водой несколько раз, после чего их переводили в деионизованную воду.

2.5. Методы исследований

Исследование геометрических параметров образцов осуществлялось методами оптической и электронной микроскопии, а также методом динамического рассеяния света (ДРС).

Снимки методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) были получены с помощью микроскопа ТМ-1000 (Hitachi, Япония).

В экспериментах по оптической микроскопии использовался оптический микроскоп ЛОМО БИОЛАМ М-1 (АО «ЛОМО», Россия). Для обработки и автоматического анализа изображений использовалось ПО ImageJ (NIH, США). Для получения статистически достоверных результатов в ходе автоматического анализа изобра-

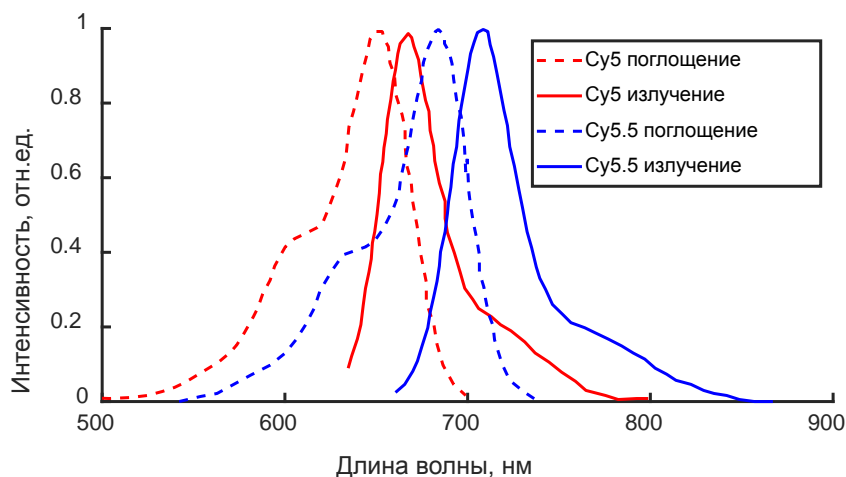


Рис. 5. Спектры поглощения и флуоресценции красителей Су5 и Су5.5

жений измерялись геометрические параметры не менее 500 частиц каждого образца.

В методе динамического рассеяния света (ДРС) исследуемая жидкая дисперсия частиц облучается лазером и регистрируется рассеянное лазерное излучение. Поскольку частицы находятся в непрерывном броуновском движении, возникают локальные неоднородности показателя преломления, которые при прохождении света через среду приводят к возникновению флуктуаций интенсивности рассеянного света. На основе анализа временной автокорреляционной функции интенсивности рассеянного света измеряется коэффициент диффузии. Гидродинамический радиус частиц затем рассчитывается по формуле Стокса–Эйнштейна.

Метод ДРС применялся для исследования синтезированных образцов на предмет наличия в них крупных агрегатов частиц. Согласно теории рассеяния света для малых частиц радиуса R , с показателем преломления n_1 в жидкости с показателем преломления n_2 интенсивность рассеянного излучения I равна:

$$I = \frac{16\pi^4 R^6}{r^2 \lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \psi I_0, \quad (1)$$

где r – расстояние от области рассеяния до точки наблюдения, λ – длина волны падающего светового пучка, n – относительный показатель преломления (n_2/n_1), ψ – угол между направлением поляризации падающей волны и направлением рассеяния, I_0 – интенсивность падающего излучения, I – интенсивность рассеянного излучения. Из формулы (1) можно видеть, что интенсивность рассеянного света определяется радиусом частицы в шестой степени. Таким образом, при анализе смеси частиц различных размеров методом ДРС интенсивность рассеянного света от частиц большего размера будет значительно выше. В связи с этим метод позволяет регистрировать даже небольшие концентрации крупных частиц в образце жидкой дисперсии.

Измерения методом ДРС проводились с помощью анализатора размеров частиц Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия). При измерениях использовался лазер с длиной волны 657 нм. Измерения проводились при температуре 23 °С. При расчёте гидродинамического радиуса частиц использовалось значение вязкости воды при заданной температуре – (0.9 сП), показатель преломления среды – 1.332. АКФ измерялась для угла рассеяния 30°, время накопления

АКФ составляло 30 секунд. Для каждого образца проводилось не менее 10 измерений.

Для получения флуоресцентных изображений спектрально-кодированных микросфер была разработана экспериментальная установка, схема которой приведена на рис. 6. Образец суспензии микросфер помещался в оптическую ячейку на предметном столе и освещался лазером. Для возбуждения флуоресценции цианиновых красителей использовался лазер с длиной волны 635 нм CPS635F (Thorlabs Inc., США). Для регистрации флуоресценции использовались полосовые фильтры 661/20 нм и 700/13 нм BrightLine (Semrock, США), для Cy5 и Cy5.5 соответственно.

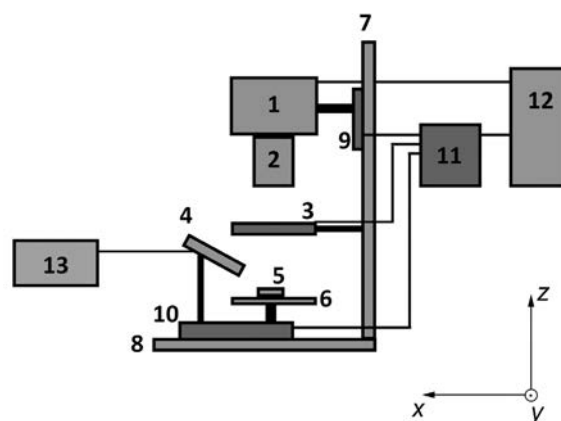


Рис. 6. Схема экспериментальной установки для флуоресцентной микроскопии микросфер: 1 - камера, 2 - объектив микроскопа, 3 - моторизованное колесо фильтров, 4 - лазер, 5 - ячейка с образцом, 6 - предметный столик, 7, 8 - вертикальная и горизонтальная направляющие, 9 - линейный транслятор для перемещения камеры вдоль оси z , 10 - линейный транслятор для перемещения образца вдоль осей x, y, z , 11 - контроллер линейных трансляторов, 12 - ПК, 13 - контроллер мощности лазера

Для получения флуоресцентных изображений микросфер использовались высокочувствительная ПЗС-камера Kingfisher 6MP (Raptor Photonics, Великобритания) и 20-кратный объектив микроскопа. Анализ полученных изображений проводился с использованием программы ImageJ.

Для оценки магнитных свойств частиц проводился также анализ образцов в анализаторе QuattroPlex (ООО «Айвок», Россия). Прибор предназначен для мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных спектрально-кодированных микросфер. В ходе

анализа микросферы иммобилизуются в прочной ячейке при помощи магнита, после чего осуществляется получение флуоресцентных изображений в разных каналах флуоресценции. На основе получаемых изображений можно сделать выводы о магнитных свойствах частиц.

3. Результаты и обсуждение

Несмотря на значительную трудоемкость двухстадийного набухания, метод стал на сегодня одним из основных для получения частиц размером более двух мкм [22–24]. Соответствующая теоретическая база метода активно развивалась из-за проблем с качеством продукта, получаемого альтернативным методом – дисперсионной полимеризацией. Для применения частиц в мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе они должны выдерживать «жесткие» растворители (например, толуол, тетрагидрофуран и т. п.), которые применяются в диффузионном методе окрашивания и методе введения наночастиц магнетита. Частицы, отвечающие таким требованиям, теоретически можно получить методом дисперсионной полимеризации: полимеризацию проводят в присутствии большой доли сшивающего агента по отношению к основному мономеру. Однако существенным недостатком метода дисперсионной полимеризации в присутствии значительного количества сшивающего агента является неконтролируемая агрегация частиц и высокое значение коэффициента полидисперсности получаемых частиц [25]. В последние годы для решения вышеуказанных проблем в методе дисперсионной полимеризации было предложено добавлять сшивающий агент после окончания нуклеации первичных частиц. Но задача определения оптимального момента добавления сшивающего агента не является тривиальной ввиду широкого диапазона условий, в которых обычно проводится синтез с целью получения нужного размера частиц и степени полидисперсности. Более того, не ясным остается то, как повлияет время добавление сшивающего агента на плотность сшивки в полученной частице [26]. Поэтому было проведено сравнение свойств частиц, полученных этими двумя методами для выбора частиц с нужными свойствами: степенью монодисперсности, долей примесей неправильной формы, магнитными свойствами, разбросом яркости флуоресценции.

3.1. Размер частиц

Для обоих образцов микросфер были получены микрофотографии методом оптической

микроскопии. В результате автоматического анализа изображений были получены сведения о среднем размере частиц, который составил 2.2 ± 0.7 мкм для образца № 1 и 6.5 ± 0.4 мкм для образца № 2.

Оптимальный размер частиц для применения в иммунофлуоресцентном анализе на основе микросфер определяется инструментальными и биохимическими факторами. Так, возможность применения частиц малого диаметра (менее 0.5 мкм) ограничена сложностью их детектирования, а также низкой степенью адсорбции аналита, связанной с малой площадью поверхности микросфер. Данные факторы значительно снижают чувствительность анализа. В то же время большая площадь поверхности микросфер (диаметра более 9 мкм) может послужить причиной неравномерного распределения аналита в процессе анализа, а также причиной большого расхода дорогостоящих реагентов (в первую очередь – антител). Так, например, магнитные полистирольные микросферы, приготовленные методом распылительной суспензионной полимеризации, имеют узкое распределение по размерам, но большой средний диаметр – около 10 мкм [27].

Таким образом, микросферы размером 2.2 и 6.5 мкм являются подходящими для использования в иммунофлуоресцентном анализе.

3.2. Форма частиц

Отличие формы частиц от сферической затрудняет анализ изображений в процессе иммунофлуоресцентного анализа и негативно сказывается на его точности [28].

С целью количественной оценки данного параметра на основе полученных микрофотографий образцов был измерен коэффициент округлости k_c частиц:

$$k_c = 4\pi \frac{A}{P^2}, \quad (2)$$

где A – площадь частицы, а P – длина её внешней границы на изображении. Таким образом, значение $k_c = 1$ соответствует идеальной окружности, а значения k_c , приближающиеся к 0, соответствуют более вытянутой форме частиц.

Измеренные значения коэффициента округлости составили 0.90 ± 0.02 для образца № 1 и 0.92 ± 0.02 для образца № 2. Таким образом, для обоих синтезированных образцов отличие формы частиц от сферической является незначительным и не будет оказывать негативного влияния на результаты анализа.

3.3. Степень монодисперсности

Также важным параметром является монодисперсность частиц. Во-первых, высокая степень монодисперсности необходима для точной идентификации микросфер, так как интенсивность флуоресценции отдельной микросферы зависит от её размера. Это особенно важно в случае кодирования микросфер разной концентрацией флуоресцентного красителя.

Во-вторых, от степени монодисперсности будет зависеть точность определения концентрации аналита, поскольку кинетика реакции на поверхности микросферы и интенсивность флуоресценции метки зависят от площади поверхности частицы [29].

Результаты исследования методом оптической микроскопии указывают на достаточно высокую степень монодисперсности обоих образцов – коэффициент вариации составил 7.4 % для образца № 1 и 6.2 % для образца № 2.

Для сравнения, в работе [30] описываются микросферы, синтезированные методом дисперсионной полимеризации в спиртовой среде, коэффициент вариации размеров которых составил от 14.2 до 21.7 % в зависимости от количества стабилизатора.

3.4. Наличие примесей и агрегатов частиц

Наличие агрегатов частиц может оказывать негативное влияние на результаты иммунофлуоресцентного анализа, поскольку такие частицы в ходе анализа либо будут давать ложный сигнал флуоресценции, либо не будут учитываться в анализе, в зависимости от параметров оптической системы и параметров обработки изображений прибора [31].

На полученных микрофотографиях синтезированных образцов присутствовали отдельные частицы неправильной формы. Была измерена относительная концентрация примесей c_{imp} по данным оптической микроскопии:

$$c_{imp} = \frac{N_{imp}}{N} \times 100 \%$$

где N_{imp} – количество примесей, N – общее количество частиц. К примесям относили распознанные на изображениях частицы, имеющие коэффициент округлости менее 0.8 или диаметр, отличающийся от среднего значения более чем на 30 %.

Измеренное значение c_{imp} составило 4.1 % для образца № 1 и 8.4 % для образца № 2. При этом значительную часть примесей составляли крупные агрегаты частиц. Поскольку по данным оптической микроскопии затруднительно отличить агрегаты частиц от близко расположенных на микрофотографии частиц, синтезированные образцы жидких дисперсий микрочастиц были исследованы методом ДРС. Метод ДРС позволяет зарегистрировать даже небольшие концентрации крупных частиц в образце жидкой дисперсии.

В результате было установлено, что в составе жидкой дисперсии микросфер образца № 2 присутствуют частицы больших размеров, в то время как образец №1 практически не содержит крупных агрегатов частиц (рис. 7).

Образец №2 был подвергнут обработке ультразвуком в ультразвуковой ванне с частотой 22 кГц и мощностью 75 Вт в течение 5 минут. В результате повторного измерения было установле-

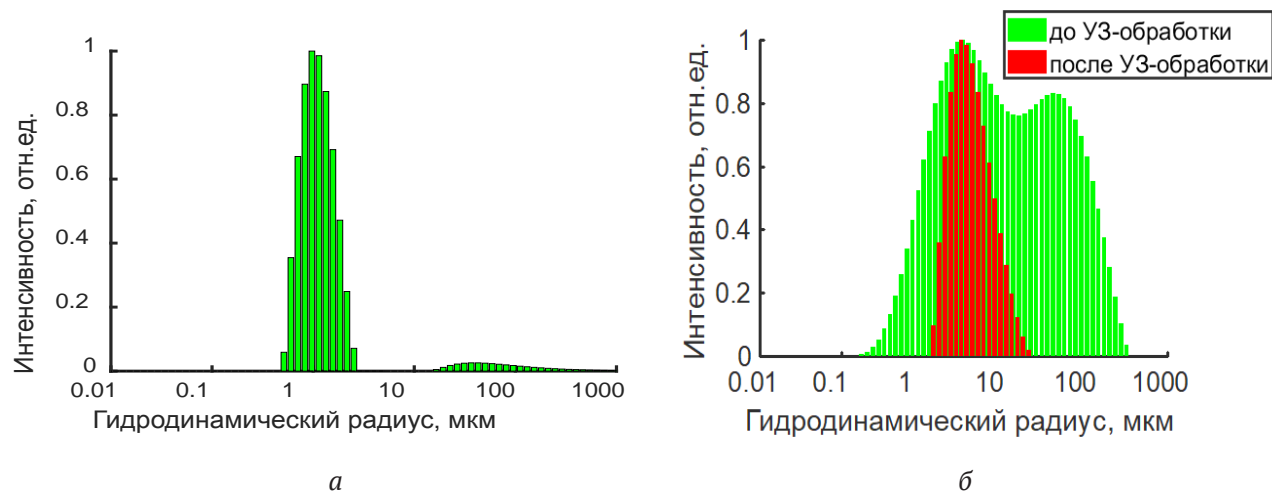


Рис. 7. Распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц для образцов № 1 (а) и № 2 (б)

но, что агрегаты больших размеров в дисперсии отсутствовали (рис. 7б). Таким образом, можно сделать вывод, что частицы в образце № 2 более склонны к агрегации в сравнении с образцом № 1.

Однако для предотвращения агрегации могут быть использованы поверхностно-активные вещества и стабилизаторы, кроме того, при использовании в иммунофлуоресцентном анализе частицы имеют оболочку из карбоксильных групп, препятствующую агрегации частиц [32, 33].

Таким образом, выявленную склонность к агрегации частиц в образце №2 следует учитывать при дальнейшей работе с микросферами, однако она не является фактором, препятствующим применению микросфер в методах иммуноанализа.

3.5. Магнитные свойства

Для возможности использования микросфер в планарном иммуноанализе они должны обладать достаточными магнитными свойствами, например, за счёт высокого содержания магнетита [34]. Это условие обусловлено необходимостью иммобилизации микросфер в ячейке при помощи магнита для проведения анализа [35].

В данной работе наличие магнитных свойств у образцов синтезированных микросфер оценивалось визуально, при помощи оптического микроскопа. К ячейке с микросферами в жидкой дисперсии подносился неодимовый магнит. После чего микросферы обоих образцов выстраивались вдоль линий магнитной индукции, что свидетельствует о наличии у микросфер магнитных свойств.

Эффективность иммобилизации микросфер в ячейке при помощи магнита оценивалось путём анализа образцов в приборе для мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа QuattroPlex. В ходе анализа микросферы иммобилизовались в проточной ячейке при помощи магнита, после чего осуществлялось получение флуоресцентных изображений в разных каналах флуоресценции.

В результате проведённого исследования было установлено, что магнитные свойства микросфер обоих образцов позволяют, во-первых, собрать микросферы из всего объёма ячейки в одной плоскости при помощи магнита, во-вторых удерживать их неподвижно в течение времени, необходимого для получения флуоресцентных изображений в нескольких каналах (порядка 1 минуты), предотвращая смещение микросфер под действием силы тяжести, что также немаловажно, поскольку смещение микросфер

на изображениях, полученных в разных каналах, не позволяет учитывать их при анализе изображений в процессе мультиплексного иммуноанализа.

3.6. Флуоресценция

Микросферы каждого типа были окрашены флуоресцентными красителями Cy5 и Cy5.5 по отдельности, а также обоими красителями в разной концентрации.

Были исследованы такие параметры флуоресценции синтезированных микросфер как интенсивность флуоресценции (яркость микросфер на изображении) и равномерность распределения красителя.

Яркость микросфер на изображении сравнивалась с яркостью эталонных частиц. Следует отметить, что эталонные частицы содержали в составе другие флуоресцентные красители, и для получения изображений использовались соответствующие им фильтры. В остальном условия эксперимента были идентичны. Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы выяснить возможно ли получение флуоресцентных изображений образцов синтезированных микросфер с сопоставимым временем выдержки камеры, а также сделать выводы о необходимой концентрации красителя.

В качестве эталонных использовались микросферы Luminex с наибольшей и наименьшей концентрацией красителя (12 и 78 регион).

Получаемые 16-битные изображения содержат распределение 2^{16} градаций яркости. Выдержка камеры подбиралась таким образом, чтобы микросферы с наименьшей концентрацией красителя были различимы (чтобы значение их яркости на изображении в два раза превышало среднее значение яркости для фонового шума), при условии, что микросферы с наибольшей концентрацией красителя не были засвечены на изображении (т. е. значение их яркости на изображении не превышало 65 535 усл.ед.).

Анализ полученных изображений проводился с использованием ПО ImageJ. Отдельные частицы идентифицировались по пороговому значению интенсивности на изображении. Затем измерялась средняя интенсивность на изображении каждой обнаруженной частицы. Во избежание ложного распознавания двух агрегированных частиц как одной, игнорировались частицы со значением округлости менее 0.8. Значение округлости вычислялась по формуле (2).

В результате, для синтезированных образцов выбранное значение выдержки в обоих каналах

флуоресценции (соответствующих Су5 и Су5.5) составило 5 секунд для образца № 1 и 20 секунд для образца №2, при выдержке 3.5 секунды для эталонных микросфер. Таким образом, можно сделать вывод, что для образца № 1 выбранные концентрации красителя близки к оптимальным, а для образца № 2 следует увеличить концентрацию красителя, чтобы сократить время анализа.

Равномерность распределения красителя для отдельных микросфер одного образца является важным параметром, поскольку определяет разброс яркости микросфер на изображении. В связи с тем, что динамический диапазон камеры ограничен, от разброса яркости микросфер одного типа зависит максимально возможное количество различимых типов микросфер и, следовательно, мультиплексность анализа.

На основе анализа полученных изображений были рассчитаны значения коэффициента вариации интенсивности флуоресценции, характеризующие разброс яркости микросфер одного типа (табл. 1). В работе [36] описан метод синтеза частиц, обладающих высокой степенью однородности и имеющих коэффициент вариации флуоресценции 3.7 %, однако такие частицы имеют достаточно большой размер (от 10 мкм) и не являются магнитными. Поэтому в качестве эталонных частиц для сравнения были выбраны

магнитные флуоресцентные микросферы Luminox. Анализ проводился по 5 флуоресцентным изображениям для каждого образца микросфер в обоих каналах флуоресценции.

Можно заметить, что для микросфер образца № 2 характерен большой разброс яркости в обоих каналах флуоресценции. Таким образом, наиболее равномерное распределение флуоресцентного красителя имеет образец № 1, что делает его более перспективным для применения в иммунофлуоресцентном анализе.

Были также получены флуоресцентные изображения для смеси двух типов микросфер образца № 1, различающихся концентрацией одного красителя. В результате была показана возможность идентификации микросфер с разной концентрацией красителя по яркости на изображении (рис. 8).

Были также получены флуоресцентные изображения двух типов микросфер образца № 1, содержащих оба флуоресцентных красителя в разной концентрации.

В результате анализа полученных изображений было показано, что коэффициент вариации интенсивности флуоресценции на изображении для обоих типов флуоресцентных красителей и для обоих образцов микросфер с различной концентрацией красителей также составляет менее 10 % (рис. 9).

Таблица 1. Коэффициент вариации интенсивности флуоресценции микросфер

Образец	Коэффициент вариации интенсивности флуоресценции, %	
	Су5 / Краситель 1	Су5.5 / Краситель 2
Образец № 1	8.8±0.2	9.4±0.3
Образец № 2	16.1±0.6	19.6±0.8
Эталонные микросферы	7.4±0.2	7.9±0.2

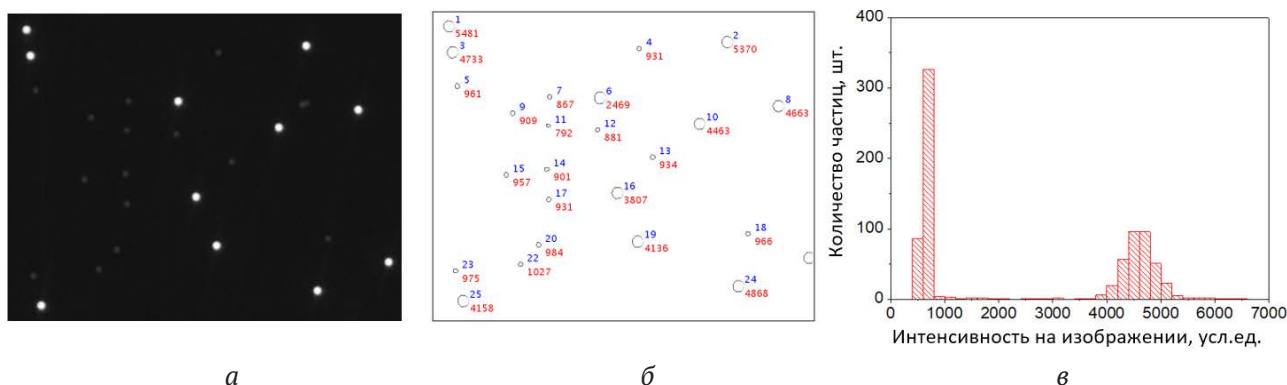


Рис. 8. а) Фрагмент полученного флуоресцентного изображения смеси микросфер образца № 1 с высокой и низкой концентрацией красителя Су5; б) анализ того же фрагмента изображения: верхнее число – номер обнаруженной на изображении частицы, нижнее число – средняя интенсивность флуоресценции обнаруженной частицы; в) распределение микросфер с различной интенсивностью флуоресценции на полученном изображении

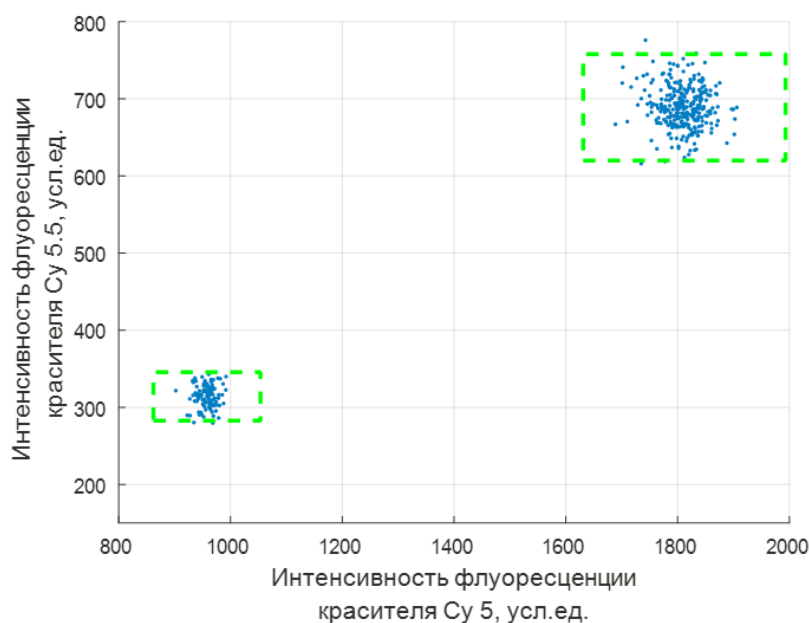


Рис. 9. Результат анализа полученных флуоресцентных изображений двух типов микросфер с красителями Cy5 и Cy5.5 образца № 1. Пунктирные прямоугольники соответствуют 10 % отклонению от среднего значения

Низкий коэффициент вариации интенсивности флуоресценции позволяет закодировать путём внесения разной концентрации флуоресцентного красителя большое количество типов микросфер – не менее 36 регионов, что является достаточным для подавляющего большинства применений метода мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа.

4. Выводы

В результате проведённых исследований было установлено, что микросферы в обоих образцах имеют оптимальные размеры для использования в иммунофлуоресцентном анализе и высокую степень монодисперсности, не содержат статистически значимого количества примесей неправильной формы. Магнитные свойства микросфер обоих образцов позволяют быстро и надёжно иммобилизовать микросферы в одной плоскости измерительной ячейки при помощи магнита. В то же время для микросфер, синтезированных методом двухстадийного набухания, характерен большой разброс яркости флуоресценции. Поэтому с точки зрения равномерности распределения флуоресцентного красителя более перспективным для применения в иммунофлуоресцентном анализе представляется использование микросфер, синтезированных методом дисперсионной полимеризации.

Была показана возможность идентификации микросфер с различными красителями и разной концентрацией красителей на изображении. Низкий коэффициент вариации интенсивности флуоресценции даёт возможность использовать в иммунофлуоресцентном анализе большое количество типов спектрально-кодированных микросфер, и, следовательно, выявлять большое количество патогенов одновременно. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых диагностических мультиплексных тест-систем на основе спектрально-кодированных микросфер.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы

1. Gu Z., Zhao, S., Xu G., Chen C., Wang Y., Gu H., Xu H. Solid-phase PCR based on thermostable, encoded magnetic microspheres for simple, highly sensitive and multiplexed nucleic acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019;298: 126953. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126953>
2. Su R., Tang X., Feng L., Yao G. L., Chen J. Development of quantitative magnetic beads-based flow cytometry fluorescence immunoassay for aflatoxin B1. *Microchemical Journal*: 2020;155: 104715. <https://doi.org/10.1016/j.mic.2020.104715>

org/10.1016/j.microc.2020.104715

3. Klisara N., Peters J., Haasnoot W., Nielen M. W., Palaniappan A., Liedberg B. Functional fluorescence assay of botulinum neurotoxin A in complex matrices using magnetic beads. *Sensors and Actuators B: Chemical*: 2019;281: 912–919. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.100>

4. Jin M., Luo J., Dou X., Yang M., Fan Z. A sensitive cytometric bead array for chlorpyrifos using magnetic microspheres. *Microchemical Journal*. 2020;156: 104847. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104847>

5. Ding L., Chen X., He L., Yu F., Yu S., Wang J., Qu L. Fluorometric immunoassay for the simultaneous determination of the tumor markers carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 fragment using two kinds of CdSe/ZnS quantum dot nanobeads and magnetic beads. *Microchimica Acta*. 2020;187(3): 1–8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-019-3914-7>

6. Wei X., Bian F., Cai X., Wang Y., Cai L., Yang J., Zhao Y. Multiplexed detection strategy for bladder cancer microRNAs based on photonic crystal barcodes. *Analytical Chemistry*. 2020;92(8): 6121–6127. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c00630>

7. Priest J. W., Moss D. M. Measuring cryptosporidium serologic responses by multiplex bead assay. In: Mead J., Arrowood M. (eds). *Cryptosporidium. Methods in Molecular Biology*, vol. 2052. New York, NY: Humana; 2020. 61–85 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9748-0_5

8. Chen J. H.-K., Yip C. C.-Y., Chan J. F.-W., Poon R. W. S., To K. K.-W., Chan K. H., Yuen K. Y. Clinical performance of the luminex NxTAG CoV extended panel for SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal specimens of COVID-19 patients in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(8): e00936-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.00936-20>

9. Wilson R., Spiller D. G., Prior I. A., Veltkamp K. J., Hutchinson A. A simple method for preparing spectrally encoded magnetic beads for multiplexed detection. *ACS Nano*. 2007;1(5): 487–493. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn700289m>

10. Graham H., Chandler D. J., Dunbar S. A. The genesis and evolution of bead-based multiplexing. *Methods*. 2019;158: 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.01.007>

11. Ligler F. S., Kim J. S. *The Microflow Cytometer*. Boca Raton: Pan Stanford Publ.; 2010. 394 p. <https://doi.org/10.1201/9780429109157>

12. Dunbar S. A. Bead-based suspension arrays for the detection and identification of respiratory viruses. In: Tang Y. W., Stratton C. (eds) *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. Boston, MA; Springer: 2013. 813–833 pp. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3970-7_42

13. Mountjoy K. G. ELISA versus LUMINEX assay for measuring mouse metabolic hormones and cytokines: sharing the lessons I have learned. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2020: 1–20. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1838924>

14. Ligler F. S., Erickson J. S., Golden J. P., Kim J. S., Nasir M., Howell P. J., Thangawng A. L., Hilliard L., Anderson G. P. Microflow cytometer. In: *Proc. SPIE 7167, Frontiers in Pathogen Detection: From Nanosensors to Systems, 71670N, 19 February 2009*. <https://doi.org/10.1117/12.807671>

15. Germeraad E. A., Achterberg R.P., Venema S., Post J., de Leeuw O., Koch G., van der Wal F.J., Beersens N. The development of a multiplex serological assay for avian influenza based on Luminex technology. *Methods*. 2019;158: 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.01.012>

16. Choi J., Kwak, S. Y., Kang S., Lee S. S., Park M., Lim S., Hong S. I. Synthesis of highly crosslinked monodisperse polymer particles: effect of reaction parameters on the size and size distribution. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2002;40(23): 4368–4377. <https://doi.org/10.1002/pola.10514>

17. Barrett K. E. *Dispersion polymerization in organic media*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1975. 338 p.

18. Lok K. P., Ober C. K. Particle size control in dispersion polymerization of polystyrene. *Canadian Journal of Chemistry*. 1985;63(1): 209–216. <https://doi.org/10.1139/v85-033>

19. Ugelstad J., Mork P. C., Kaggerud K. H., Ellingsen T., Berge A. Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1980;13(1-2): 101–140. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(80\)87003-5](https://doi.org/10.1016/0001-8686(80)87003-5)

20. Ugelstad J., Mfutakamba H. R., Mørk P. C., Ellingsen T., Berge A., Schmid R., Nustad K. Preparation and application of monodisperse polymer particles. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*. 1985;72(1): 225–240. <https://doi.org/10.1002/polc.5070720125>

21. Lee J. H., Gomez I. J., Sitterle V. B., Meredith J. C. Dye-labeled polystyrene latex microspheres prepared via a combined swelling-diffusion technique. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;363(1): 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.047>

22. Ugelstad J.; Kaggerud K. H.; Hansen F. K.; Berge A. Absorption of low molecular weight compounds in aqueous dispersions of polymer-oligomer particles. A two step swelling process of polymer particles giving an enormous increase in absorption capacity. *Die Makromolekulare Chemie*. 1979;180(3): 737–744. <https://doi.org/10.1002/macp.1979.021800317>

23. Okubo M., Shiozaki M., Tsujihiro M., Tsukuda Y. Preparation of micron-size monodisperse polymer particles by seeded polymerization utilizing the dynamic monomer swelling method. *Colloid and Polymer Science*. 1991;269(3): 222–226. <https://doi.org/10.1007/bf00665495>
24. Bedre J., Chandler D., Mize B. *Method and system for manufacture and use of macroporous beads in a multiplex assay*. Patent US9745438B2. 2009. Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/US9745438B2>
25. Song J.S., Winnik M.A. Cross-linked, monodisperse, micron-sized polystyrene particles by two-stage dispersion polymerization. *Macromolecules*. 2005;38(20): 8300–8307. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma050992z>
26. Gao H., Matyjaszewski K. Synthesis of functional polymers with controlled architecture by CRP of monomers in the presence of cross-linkers: From stars to gels. *Progress in Polymer Science*. 2009;34(4): 317–350. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.01.001>
27. Yang C., Guan Y., Xing J., Liu J.; Shan G., An Z., Liu H. Preparation of magnetic polystyrene microspheres with a narrow size distribution. *AIChE Journal*. 2005;51(7): 2011–2015. <https://doi.org/10.1002/aic.10467>
28. Šálek P., Horák D. Hypercrosslinked polystyrene microspheres by suspension and dispersion polymerization. *e-Polymers*. 2011;11(1). <https://doi.org/10.1515/epoly.2011.11.1.688>
29. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. *Progress in Polymer Science*. 2000;25(8): 1171–1210. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00024-1)
30. Hong J., Lee J., Rhym Y. M., Kim D. H., Shim S. E. Polyelectrolyte-assisted synthesis of polystyrene microspheres by dispersion polymerization and the subsequent formation of silica shell. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;344(2): 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.001>
31. Liu N., Li Y., Liang W., Liu Y. Fluorescence-encoded polystyrene microspheres for the application of suspension array technology. *Materials for Biomedical Engineering*. 2019: 221–267. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818433-2.00007-8>
32. Tobias C., Climent E., Gawlitza K., Rurack K. Polystyrene microparticles with convergently grown mesoporous silica shells as a promising tool for multiplexed bioanalytical assays. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;13(1): 207–218. <https://doi.org/10.1021/acsmi.0c17940>
33. Serkhacheva N. S., Gainanova A. A., Kuz'micheva G. M., Podbelskiy V. V., Sadovskaya N. V., Zybinskiy A. M., Domoroshchina E. N., Dorokhov A. V., Chernyshev V. V., Prokopov N. I., Gerval'd A. Yu. Composites based on polystyrene microspheres with nano-scaled titanium dioxide. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 2015;20(8): 743–753. <https://doi.org/10.1080/1023666x.2015.1081190>
34. Liu G., Guan Y., Ge Y., Xie L. Preparation of monodisperse magnetic polystyrene microspheres and its surface chemical modification. *Journal of Applied Polymer Science*. 2011;120(6): 3278–3283. <https://doi.org/10.1002/app.33495>
35. Pushparaj P. N. Multiple analyte profiling (xMAP) technology coupled with functional bioinformatics strategies: potential applications in protein biomarker profiling in autoimmune inflammatory diseases. In: Shaik N., Hakeem K., Banaganapalli B., Elango R. (eds). *Essentials of Bioinformatics, Volume II*. Springer, Cham.; 2019. 151–165 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18375-2_9
36. Fulwyler M. J., Perrings J. D., Cram L. S. Production of uniform microspheres. *Review of Scientific Instruments*. 1973;44(2): 204–206. <https://doi.org/10.1063/1.1686082>

Информация об авторах

Шалаев Павел Владимирович, инженер, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва; аспирант, Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники, Зеленоград; ведущий инженер-разработчик, общество с ограниченной ответственностью «Айвок», Зеленоград, Москва, Российская Федерация; e-mail: shalaev.pv@gmail.com. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-0552-9715>.

Бондина Екатерина Владимировна, магистрант, Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники», Зеленоград, Москва, Российская Федерация; e-mail: инженер, общество с ограниченной ответственностью «Айвок», Зеленоград, Москва, Российская Федерация; e-mail: e_bondina97@mail.ru. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1986-7961>.

Санькова Наталья Николаевна, аспирант, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск; м. н. с., Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г. К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Российская Федерация; e-mail: natali_9999@bk.ru ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1913-5293>.

Пархомчук Екатерина Васильевна, к. х. н., с. н. с., Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск; с. н. с., Федеральный исследовательский центр «Инсти-

тут катализа им. Г. К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Российская Федерация; e-mail: ekaterina@catalysis.ru. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2200-884X>.

Долгушин Сергей Анатольевич, к. ф.-м. н., с. н. с., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного

академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва; директор, общество с ограниченной ответственностью «Ай-вок», Зеленоград, Москва, Российская Федерация; e-mail: dolgushin.sergey@gmail.com. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6965-6409>.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 02.12.2020; одобрена после рецензирования 20.01.2021; принята к публикации 15.02.2021; опубликована онлайн 25.03.2021.