



УДК 543.38: 543.9

Амплификация сигнала пьезокварцевого иммуносенсора на основе каликс[6]арена для определения С-реактивного белка с помощью наночастиц золота

Шашканова О.Ю., Мелихова Е.В., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Поступила в редакцию 2.09.2013 г.

Аннотация

Разработан гравиметрический пьезокварцевый иммуносенсор для определения С – реактивного белка (СРБ) в жидких средах. Изучены условия формирования иммуноаффинного покрытия на поверхности золотого электрода сенсора на основе каликс[6]арена и антител к С-реактивному белку. Показана возможность применения наночастиц золота для усиления аналитического сигнала сенсора. Установлено, что предварительное конъюгирование наночастиц золота с антителами к СРБ способствует снижению предела обнаружения СРБ с 0,02 до 0,006 мкг/мл.

Ключевые слова: пьезокварцевый иммуносенсор, С-реактивный белок, каликс[6]арен, наночастицы золота, амплификация аналитического сигнала

Gravimetric piezoelectric quartz immunosensor for the determination of C - reactive protein (CRP) in liquid environments are developed. The conditions of the formation of a immunoaffinity coating on the surface of the gold electrode sensor based on calix[6]arene and antibodies to C-reactive protein are studied. The possibility of using gold nanoparticles to enhance the analytical signal of the sensor is shown. Established, that the preliminary conjugation of gold nanoparticles with antibodies to CRP contributes to lower detection limit CRP 0.02 to 0.006 microgram/ml.

Keywords: Piezoelectric quartz immunosensor, C-reactive protein, Calix[6]arene, the gold nanoparticles, the amplification of the analytical signal

Введение

С - реактивный белок является мультифункциональным биомаркером острой фазы, играющим важную роль при воспалениях, защите от чужеродных агентов, при некрозах и аутоиммунных процессах [1-3]. В течение ряда лет по превышению концентрации СРБ свыше 5 мг/л устанавливали отсутствие системного воспалительного процесса в организме. Определение СРБ осуществляли методами латексной агглютинации, нефелометрии и турбидиметрии, радиальной иммунодиффузии, характеризующиеся невысокой чувствительностью и воспроизводимостью [4-6]. В настоящее время получены новые представления о диагностической ценности СРБ, о его возможности участия в развитии различных патологий, в частности, сердечно сосудистых заболеваний. Определение в

биологических жидкостях «фоновых» или «базовых» содержаний (hsCRP) может быть использовано для прогнозирования степени риска развития острого инфаркта миокарда, мозгового инсульта, внезапной смерти людей, не страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями [2,7]. Расширения диагностического статуса СРБ потребовало развития методов высокочувствительного определения биомаркера.

Наиболее часто для определения «базовых» содержаний применяют метод твердофазного непрямого иммуноферментного анализа (ELISA) [8], основанный на образовании «сэндвич»-структур при взаимодействии моноклональных антител к СРБ, адсорбированных в лунках микропланшета, с присутствующим в пробе анализом и антителами, меченными ферментом (пероксидазой хрена).

Альтернативой описанным выше методам может служить анализ с помощью гравиметрического пьезокварцевого иммуносенсора (ПКИ) [9-12], не требующий применения специальных меток и позволяющий проводить высокочувствительное определение аналита и наблюдать за ходом протекания иммунохимических реакций практически в режиме реального времени. Пьезокварцевые иммуносенсоры положительно зарекомендовали себя в качестве удобного инструмента для проведения биохимических и клинических исследований, сертификации пищевых продуктов и фармацевтических препаратов, мониторинга объектов окружающей среды [13,14].

Для определения высокомолекулярных соединений с помощью пьезокварцевого иммуносенсора на поверхности его электродов осуществляют иммобилизацию антител к определяемому веществу. При проведении иммобилизации необходимо обеспечить как максимальную доступность эпитопов антител, так и высокую стабильность рецепторного слоя при длительной эксплуатации в жидкости. Наиболее устойчивые покрытия формируются при ковалентном закреплении антител. Однако, при этом наблюдается снижение их аффинности. В тоже время иммобилизация антител с применением каликсаренов [15-17], позволяет получать биорецепторные слои с высокой плотностью и вертикальным расположением молекул, т.е. обеспечивает высокую концентрацию пространственно доступных центров связывания иммобилизованных биомолекул. При этом не затрагиваются активные центры рецепторных молекул, что обычно наблюдается при ковалентной иммобилизации иммуноглобулинов. Сочетание жесткой каликс[б]ареновой платформы, предоставляющей липофильную полость, и гибких фрагментов, содержащих донорные или акцепторные группы, создают благоприятные условия для внедрения и удержания «гостя» – молекул антител в полости супермолекулы, что приводит к формированию чувствительного и прочного рецепторного слоя, конформационно доступного для связывания с СРБ. Такие системы для иммобилизации антител к С-реактивному белку ранее не применялись.

Чувствительность определения СРБ с помощью гравиметрического пьезокварцевого иммуносенсора, аналитический сигнал которого зависит от массы образующегося на его поверхности иммунокомплекса, может быть повышена при применении наночастиц золота, утяжеляющих гетерогенный иммунокомплекс.

Цель настоящей работы - разработка пьезокварцевого иммуносенсора для определения С-реактивного белка на базе высокочувствительного рецепторного покрытия, сформированного на основе каликс[б]арена, и усиленного наночастицами золота.

Эксперимент

В работе использовались следующие реагенты: хлорид, гидрофосфат и азид натрия; хлорид, дигидрофосфат калия; соляная кислота ($\rho = 1,198 \text{ г/см}^3$), ацетон, пероксид водорода, хлорид олова (II) (х. ч., Россия), γ -аминопропилтриэтоксисилан (γ -APTES), глутаровый альдегид (GA) (“Reanal”, Венгрия), каликс[6]арен, С-реактивный белок (2,3 мг/мл) (“ИМТЕК”, Россия), 2-меркаптоэтиламин, 11-меркаптоундеканола (“Sigma”, USA), водные растворы хлорида олова (II) (10 %) и додецилсульфата натрия (10 %) (х. ч., Россия). ПЭГ

Фосфатный буферный раствор (pH = 7,2) содержал (г/л): NaCl (8,0); KCl (0,2); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2,9); KH_2PO_4 (0,2). Цитратный буферный раствор (pH = 4,24) содержал (г/л): $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,34), $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,47). Растворы готовили на основе бидистиллированной воды.

В качестве физического преобразователя использовали пьезокварцевые резонаторы АТ-среза с собственной частотой колебаний $10 \text{ МГц} \pm 1 \text{ Гц}$ с золотыми электродами (диаметр 8 мм), полученными магнетронным напылением золота (ЗАО «ЭТНА», Россия).

При формировании биослоя использовали антитела к С-реактивному белку (53 мг/мл, производство “ИМТЕК”, Россия), водный раствор 2-меркаптоэтиламина (20 мкг/мл), глутарового альдегида (5 %). Растворы каликс[6]арена (4 мкг/мл) и 11-меркаптоундеканола (20 мкг/мл) готовили на основе хлороформа, раствор γ -аминопропилтриэтоксисилана (5 %) – на основе ацетона. ПКИ выдерживали (а затем и хранили) во влажной камере 10 – 12 часов при $+ 4 \text{ }^\circ\text{C}$. В случае снижения аналитического сигнала сенсора более чем на 5 % старое покрытие удаляли и формировали новое.

Наночастицы золота (НЧЗ), диаметром 3-5 нм, получали путем химического восстановления золотохлороводородной кислоты хлоридом олова (II) [18]. К 1 мл цитратного буферного раствора (pH = 4,24) добавляли 50 мкл раствора ПЭГ (10 мг/л), 100 мкл 0,005 М раствора хлорида олова (II) и 1 мл 0,03 мМ золотохлороводородной кислоты, перемешивали в течение 30 мин. Коллоидный раствор наночастиц золота хранили при комнатной температуре. Стабильность и размер наночастиц контролировали на спектрофотометре СФ-46 и методом атомной силовой микроскопии.

Проточно-инжекционное определение С-реактивного белка с помощью ПКИ осуществляли в прямом формате анализа, регистрируя снижение частоты колебаний сенсора (Δf) при образовании иммунокомплекса между СРБ и антителами к нему, иммобилизованными на поверхности электрода. После измерения аналитического сигнала осуществляли регенерацию биослоя, пропуская над поверхностью сенсора регенерирующий раствор, способствующий диссоциации поверхностного иммунокомплекса. Для усиления аналитического сигнала сенсора использовали наночастицы золота. Для связывания СРБ с наночастицами золота смешивали 5 мкл раствора НЧЗ с 995 мкл пробы. Исследования проводили на лабораторной установке, изготовленной на кафедре химии Липецкого государственного технического университета [19, 20]. Для построения градуировочного графика использовали стандартные растворы С-реактивного белка с концентрацией 0,06 – 46 мкг/мл, полученные путем последовательного разбавления фосфатным буферным раствором.

Обсуждение результатов

Чувствительность и селективность определения высоко- и низкомолекулярных соединений с помощью гравиметрического иммуносенсора зависит от комплементарности иммунореагентов, а также способа иммобилизации, обеспечивающего достаточное число активных сайтов связывания биослоя и их конформационную доступность.

Изучены методы иммобилизации антител к С-реактивному белку с применением каликс[б]арена (рис. 1), закрепляемого как непосредственно на поверхности золотого электрода (способ 1), так на подложке из 2-меркаптоэтиламина (способ 2) или 11-меркаптоундеканола (способ 3). Для оценки качества рецепторного слоя применяли метод пьезокварцевого микровзвешивания, позволяющий определить массу ($\Delta m_{пл}$) и толщину ($\Delta h_{пл}$) покрытия, а также рассчитать концентрационную чувствительность (S_c) [19] (табл.1). Характеристики биослоя на основе каликс[б]арена сопоставляли с аналогичными величинами для покрытия, полученного при ковалентном закреплении антител к СРБ с помощью глутарового альдегида на подложке из γ -APTS (способ 4). Устойчивость покрытий определяли по числу циклов измерений аналитического сигнала (N) и регенерации (без снижения Δf более чем на 5%).

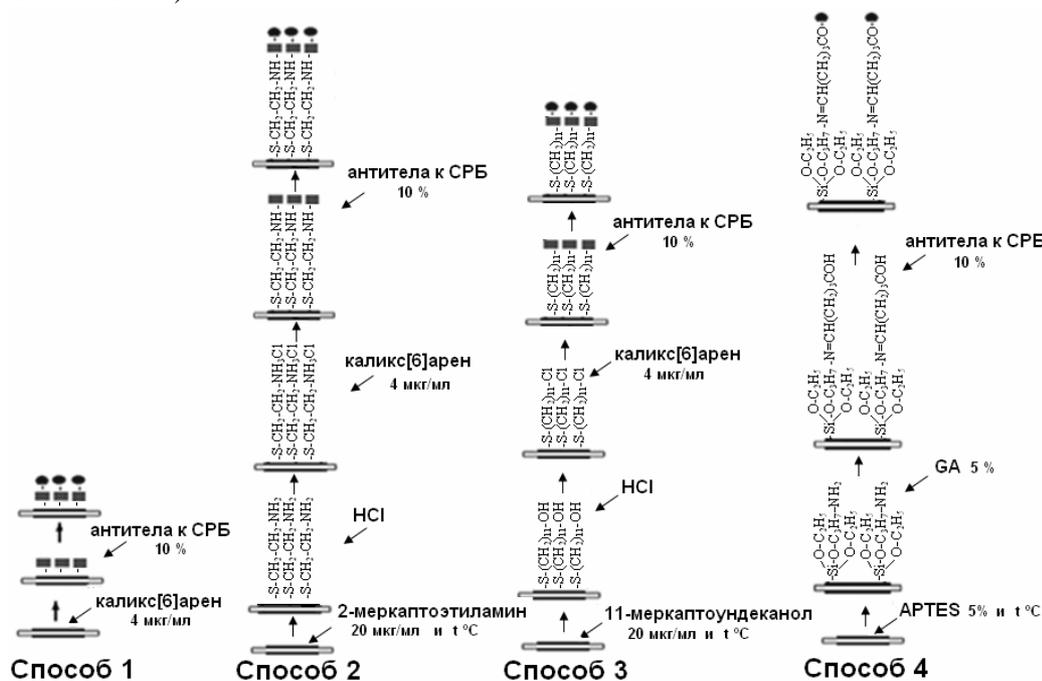


Рис. 1. Схема формирования аффинного слоя пьезокварцевого сенсора на основе антител к С-реактивному белку

Главным преимуществом иммобилизации антител к С – реактивному белку в полость каликс[б]арена является наличие прочных супрамолекулярных структур, соответствующих размерам белковых молекул антител, удобное пространственное расположение функциональных групп, на что указывают более высокие значения концентрационной чувствительности S_c . Сравнение способов иммобилизации с применением каликс[б]арена, непосредственно нанесенного на золотую поверхность электрода или через подложку на основе γ -аминопропилтриэтоксисилана, показало, что большее количество иммобилизованных молекул каликсарена, и следовательно антител, наблюдается в способе 1, о чем свидетельствуют более высокие значения

массы $\Delta m_{пл}$ каликсарена с антителами и S_c . При этом относительно небольшая общая масса и толщина покрытия позволяют проводить определение С – реактивного белка в более широком диапазоне концентраций (табл. 1) без перегрузки сенсора. Такое покрытие характеризуется удовлетворительной устойчивостью и обеспечивает проведение до 24 циклов измерения на одном биослое после регенерации. При иммобилизации анти-СРБ с применением каликс[б]арена на подложку из самоорганизованных слоев тиолов (способы 2 и 3) происходит снижение чувствительности S_c . Однако такие покрытия характеризуется высокой гидролитической устойчивостью, позволяющей осуществлять до 16 циклов измерения без существенного снижения аналитического сигнала сенсора. Недостаточная длина линкерного мостика при применении 2-меркаптоэтиламина (способ 2) влияет на конформационную доступность сайтов связывания рецепторного слоя, о чем свидетельствуют минимальные значения S_c .

Таблица. 1. Влияние способа иммобилизации на характеристики пьезокварцевого сенсора

Способ иммобилизации	$\Delta m_{пл}$, мкг	$\Delta h_{пл}$, нм	$S_c \cdot 10^{-5}$, Гц·мл·нг ⁻¹	N
1	11.1	0.34	4.4	24
2	9.75	0.34	1.4	11
3	19.4	0.68	3.3	16
4	6.51	0.23	2.2	10

Таким образом, закрепление каликс[б]арена непосредственно на золотой поверхности электрода обеспечивает более высокую концентрацию рецепторных биомолекул антител, что подтверждено кинетическими характеристиками иммунохимической реакции (табл. 2), установленными методом Скетчарда [21]. В то же время, константы аффинности антител ($K_{АФ}$), константы скорости образования (k_o) и разрушения (k_p) иммунокомплекса, полученные на биослоях, сформированном способами 2-4, различаются незначительно и являются величинами одного порядка.

Таблица 2. Кинетические характеристики иммунохимической реакции СРБ – анти-СРБ

Способ иммобилизации	$k_o \cdot 10^{-5}$	$k_p \cdot 10$	$K_{АФ} \cdot 10^{-6}$
1	7.24	2.12	3.42
2	3.38	1.84	1.84
3	5.11	1.97	2.59
4	6.51	1.99	1.36

Проточно-инжекционное определение С-реактивного белка осуществляли в прямом формате за счет взаимодействия молекул анти-СРБ с аналитом (рис.2 а). Поскольку аналитический сигнал сенсора пропорционален массе иммунокомплекса, образующегося на поверхности его электрода, была изучена возможность повышения чувствительности определения СРБ за счет присоединения к иммунокомплексу наночастиц золота. Для этого применяли предварительно синтезированные конъюгаты СРБ с НЧЗ (рис. 2 б) или к образовавшемуся на первой стадии анализа комплексу СРБ – анти-СРБ присоединяли наночастицы золота, пропуская их над поверхностью сенсора (рис.2 в).

Сопоставление значений аналитического сигнала сенсора Δf (рис. 3) для трех вариантов анализа (рис. 2) показало преимущество использования предварительно конъюгированных с НЧЗ молекул СРБ (рис. 2 б). При двухстадийном проточном-инжекционном определении СРБ (рис. 2 в) отмечается более низкая воспроизводимость аналитического сигнала Δf .

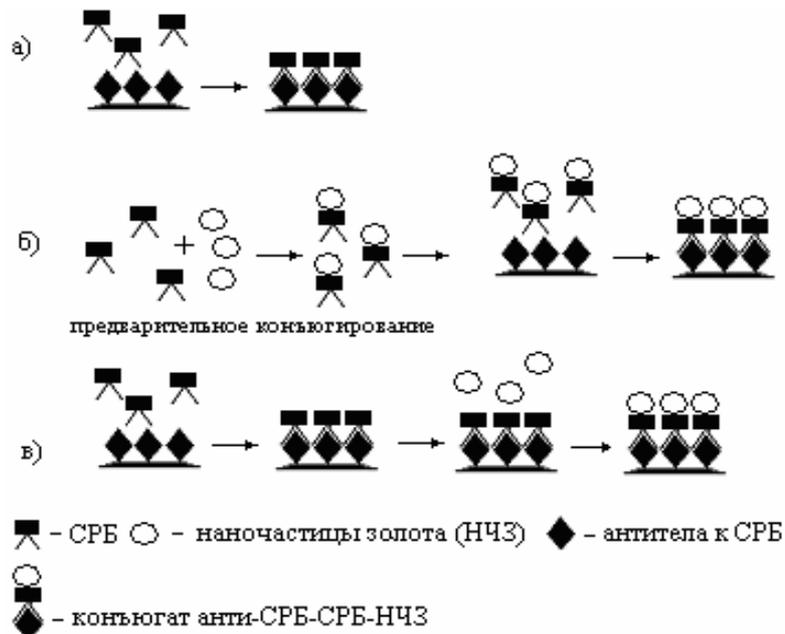


Рис. 2. Гетерогенные иммунохимические реакции, протекающие на поверхности пьезокварцевого сенсора: а) образование иммунокомплекса анти-СРБ – СРБ; б) образование иммунокомплекса анти-СРБ – СРБ-НЧЗ (полученных путем предварительного конъюгирования); в) двухстадийный анализ, включающий образование иммунокомплекса анти-СРБ – СРБ-и затем присоединение НЧЗ

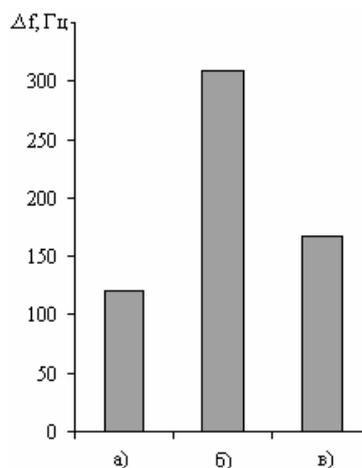


Рис. 3. Зависимость величины аналитического сигнала пьезокварцевого иммуносенсора от условий проведения анализа (обозначения соответствуют рис.2 а,б, в); $C_{\text{СРБ}} = 1,15 \text{ мкг/мл}$

Сравнение метрологических характеристик способов определения СРБ с применением и без применения наночастиц золота (табл. 3) показало, что в первом случае наблюдается расширение диапазона определяемых содержаний СРБ и происходит более чем в 3 раза снижение предел его обнаружения.

Таблица 3. Метрологические характеристики способов определения СРБ (n=3; P=0.95)

Способ определения СРБ, гетерогенный иммунокомплекс	Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл	C_{\min} , мкг/мл	Градуировочные функции
анти-СРБ – СРБ-НЧЗ	0.8 – 30	0.006	$y = 2.4x + 72$ $R^2 = 0.99$
анти-СРБ – СРБ	1.5 – 23	0.02	$y = 2.4x + 72$ $R^2 = 0.99$

Проверку правильности определения СРБ с помощью пьезокварцевого иммуносенсора осуществляли методом «введено-найдено» (табл. 4). Статистическая обработка результатов с применением критерия Стьюдента не выявило систематической погрешности в результатах анализа.

Таблица 4. Проверка правильности определения СРБ с помощью пьезокварцевого сенсора (n=3; P=0.95)

Способ определения с СРБ, гетерогенный иммунокомплекс	Введено* мкг/мл	Найдено мкг/мл	S_r
анти-СРБ – СРБ	1.53	1.52 ± 0.03	0.02
анти-СРБ – СРБ-НЧЗ	1.53	1.53 ± 0.01	0.01

* - разбавление фосфатным буферным раствором исходного раствора СРБ ($c = 2,3\text{мг/мл}$) в соотношении 1:1500

Таким образом, пьезокварцевый гравиметрический иммуносенсор, усиленный наночастицами золота, характеризуются высокой чувствительностью, селективностью и может быть рекомендован для определения следовых концентраций С-реактивного белка в жидких биопробах.

Список литературы

1. Шевченко О.П. Белки острой фазы воспаления // Лаборатория. 1996. №1. С. 3-6.
2. Вельков В.В. С-реактивный белок – структура, функция, методы определения, клиническая значимость // Лабораторная медицина. 2006. №8. С. 1-7.
3. Фомин В.В., Козловская Л.В. С-реактивный белок и его значение в кардиологической практике // Журнал доказательной медицины для практикующих врачей. 2003. №5. С. 12—17.
4. Price C.P. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein // J Immunol Methods. 1987. V. 99. P. 205-211.
5. Шевченко О.П. Высокочувствительный анализ С-реактивного белка и его применение в кардиологии // Лабораторная медицина. 2003. Вып. 6. С. 35-41.
6. Evaluation of a C-reactive protein latex agglutination detection test with sera from patients with sexually transmitted diseases // J Clin. Microbiol. 1984. V. 20. P. 1171–1173.

7. Paimany B. Clinical application of high sensitivity C-reactive protein // *Cardiol Rev.* 2002. V.19. P.19–22.
8. <http://www.ebioscience.com/human-c-reactive-protein-elisa-kit.htm>
9. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевые иммуносенсоры. Аналитические возможности и перспективы // *Успехи химии.* 2006. Т.75. Вып. 5. С.445-459.
10. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашканова О.Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики // *Российский химический журнал.* 2008. Т.ЛII. Вып. 2. С.17-29.
11. Kim N., Kim D.K., Cho Y.J. Development of indirect-competitive quartz crystal microbalance immunosensor for C-reactive protein // *Sensors and Actuators, B.* 2009. V.143. P. 444-448.
12. Aizawa H., Kurosawa S., Ogawa K., Yoshimoto M., Miyake J., Tanaka H. Conventional diagnosis of C-reactive protein in serum using latex piezoelectric immunoassay // *Sensors and Actuators, B.* 2001. V.76. P. 173–176/
13. Калмыкова Е.Н., Мелихова Е.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Определение сульфаметоксазола с помощью пьезокварцевого иммуносенсора // *Антибиотики и химиотерапия.* 2004. Т. 49. № 1. С. 8.
14. Ермолаева Т.Н., Дергунова Е.С., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А. Проточно-инжекционное определение нонилфенола в жидких средах с помощью пьезокварцевого иммуносенсора // *Журн. аналит. химии.* 2006. Т. 61. № 6. С. 660-665.
15. Kushal S., Peter J. Calixarene based chemical sensors // *Chemical Sensors.* 2011. V.9. P. 1-18.
16. Chen L., He X., Hu X., Xu H. Calixarene-coated piezoelectric quartz crystal sensor for the detection of organic amine in liquids // *Analyst.* 1999. V. 124. P. 1787–1790.
17. Lee Y., Lee E-K., Cho Y.W., Matsui T., Kang I.Ch., Kim T.S., Han M.H. ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies // *Proteomics.* 2003. V. 3. P. 2289–2304.
18. Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н. Применение золотых наночастиц для усиления сигнала пьезокварцевого иммуносенсора // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* 2010. Вып.3. С. 37-41.
19. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевые сенсоры: аналитические возможности и перспективы: монография. Липецк: ЛГТУ. 2007. 190 с.
20. Воронежцева О.В., Нартова Ю.В., Ермолаева Т.Н., Еремин С.А. Иммунохимические реакции, протекающие на поверхности пьезокварцевого сенсора при определении стрептомицина в пищевых продуктах // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2009. Т. 9, Вып.5. С. 694-702.
21. Калмыкова Е.Н., Мелихова Е.В., Дергунова Е.С., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Кинетические исследования аффинного взаимодействия и их применение при разработке пьезокварцевых иммуносенсоров // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2004. Т.4. Вып. 5. С. 597 – 602.

Шашканова Ольга Юрьевна – к.х.н., доцент кафедры химии, Липецкий государственный технический университет, Липецк

Мелихова Елена Владимировна – к.х.н., доцент кафедры химии, Липецкий государственный технический университет, Липецк

Ермолаева Татьяна Николаевна – д.х.н., профессор кафедры химии, Липецкий государственный университет, Липецк

Shashkanova Olga Yu. – candidate of chemical science, associate professor of the chair of chemistry, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Melihova Elena V. - candidate of chemical science, associate professor of the chair of chemistry, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. – doctor of chemistry, professor of the chair of chemistry, Lipetsk State Technical University, Lipetsk