



УДК 543.63

Применение наночастиц полистирольного латекса для определения бисфенола А с помощью иммуноаффинного пьезосенсора

Дергунова Е.С., Мухортова Д.В., Ермолаева Т. Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Поступила в редакцию 8.09.2010 г.

Аннотация

Предложена новая методика определения бисфенола А в жидких средах с помощью проточного пьезокварцевого иммуносенсора, усиленного наночастицами полистирольного латекса. Рассчитаны константы аффинности и коэффициенты перекрестного реагирования иммунореагентов. Установлено, что максимальная чувствительность определения бисфенола А достигается при использовании гаптен-белкового конъюгата BPA-BSA, антител An-HPVA и наночастиц полистирольного латекса размером 45 нм.

Ключевые слова: пьезокварцевый иммуносенсор, бисфенол А, наночастицы

The paper presents the results of the determination of bisphenol A using piezoelectric immunosensor. The influence of polymer nanoparticles to increase the analytical signal piezoelectric detector. The effect of the protein molecule svhodyaschey in the hapten-protein conjugate on the sensitivity of determination of the toxicant. We estimate the affinity and specificity used immunoreagentov. It is shown that the maximum sensitivity of the detection is achieved using hapten-protein conjugate BPA-BSA, antibody An-HPVA and nanoparticles of polystyrene latex size of 45 nm.

Keywords: piezoelectric quartz immunosensor, bisphenol A, nanoparticles

Введение

Аналитический сигнал пьезокварцевого иммуносенсора прямо пропорционален массе иммунокомплекса, образующегося на поверхности его электродов [1]. Одним из приемов повышения чувствительности и снижения предела обнаружения является увеличение присоединенной массы за счет наночастиц металлов или полимеров. Наиболее часто для этой цели используются наночастицы золота [2] или серебра, значительно реже полимерные частицы. Однако в иммунохимическом анализе довольно широко применяется реакция латексной агглютинации [3], в которой антитела, закрепленные на полистирольных частицах комплементарно, реагируют с антигенами. При этом образуются комплексы, масса которых многократно превышает массу биомолекул.

Цель данной работы – разработка методики определения бисфенола А с применением наночастиц полистирольного латекса для усиления сигнала пьезокварцевого сенсора.

Эксперимент

В качестве физических преобразователей сенсоров применяли пьезокварцевые резонаторы АТ-среза (собственная частота колебаний $10 \text{ МГц} \pm 1 \text{ Гц}$) с электродами диаметром 5 мм, полученными магнетронным напылением золота (ЗАО «ЭТНА», Россия). Имобилизация ВРА-белкового конъюгата на поверхности пьезокварцевого резонатора проводилась аналогично описанной ранее [4]. Исследования выполнялись на оригинальной установке, изготовленной на кафедре химии ЛГТУ, описанной в работе [5]. Синтез латексных частиц осуществляли методом эмульсионной полимеризации с применением в качестве эмульгатора - олеата натрия, в качестве инициатора - персульфата калия [6]. Размер частиц устанавливали методами атомной силовой микроскопии и турбидиметрии [7].

Гаптен-белковые конъюгаты ВРА-BSA, ВРА-OVA, ВРА-STI были получены путем связывания бисфенола А с различными протеинами (BSA – бычий сывороточный альбумин, OVA - овалбумин, STI – соевый трипсиновый ингибитор) по методике, аналогичной описанной в [8]. Куриные антисыворотки, содержащие поликлональные антитела к бисфенолу А Kip 28/4 и An-HPVA предоставлены В. De Meulenaer (Лаборатория пищевой химии и анализа, Университет Гента, Бельгия) и R. A. Abuknesha (Королевский колледж, Лондон, Великобритания).

Обсуждение результатов

При определении низкомолекулярных соединений с помощью пьезокварцевого иммуносенсора необходимо использовать конкурентный формат анализа, в котором аналит, закрепленный на поверхности его электродов конкурирует с аналитом, присутствующим в пробе за взаимодействие с ограниченным количеством антител. При этом аналитический сигнал обратно пропорционален концентрации определяемого соединения. Для увеличения чувствительности определения бисфенола А предварительно к раствору антител добавляли фиксированное количество (5 мкл) полистирольного латекса (диаметр частиц 36 – 80 нм), выдерживали 15 мин для образования конъюгата латекс-антитело и проводили анализ по конкурентной схеме: в анализируемую пробу вводили 200 мкл раствора комплекса латекс-антитело, доводили объем до 1 мл фосфатным буферным раствором (рН 7,2) и инкубировали 2-3 мин до завершения гомогенной иммунохимической реакции и затем применяли для определения бисфенола А с использованием пьезокварцевого иммуносенсора.

Для установления аффинности иммунореагентов проведены кинетические исследования взаимодействия свободных (АТ) и связанных антител с латексными частицами (АТ*) с гаптен-белковым конъюгатом (ВРА-BSA, ВРА-OVA или ВРА-STI), иммобилизованным на поверхности электрода. Кинетическое уравнение обратимой гетерогенной иммунохимической реакции ВРА-BSA + АТ \rightleftharpoons BSA-ВРА-АТ или ВРА-BSA + АТ* \rightleftharpoons BSA-ВРА-АТ* может быть представлено в следующем виде с учетом пропорциональности сигнала сенсора концентрации образовавшегося иммунного комплекса (BSA-ВРА-АТ или BSA-ВРА-АТ*):

$$-df/dt = (k_o \cdot C + k_p) \cdot f - k_o f_m C \quad (1)$$

где C – концентрация антител в растворе; f_m и f – частота сенсора перед началом и в ходе измерений, k_o , k_p – константы скорости образования и разрушения иммунного комплекса, соответственно. Используя методику Скетчарда, модифицированную для

пьезокварцевых иммуносенсоров [9], были получены константы скорости прямой и обратной реакции. Константу связывания свободных (АТ) и связанных антител с латексными частицами (АТ*) с гаптен-белковым конъюгатом (K_A) (табл.1) определяли как отношение k_o / k_p [9].

Таблица 1. Константы аффинности реакции взаимодействия гаптен-белкового конъюгата с антителами (K_A) и с антителами, закрепленными на поверхности полистирольных частиц ($*K_A$), диаметр частиц 45 нм

| Гаптен-белковые конъюгаты | | | |
|-------------------------------|---------|---------|---------|
| | ВРА-BSA | ВРА-OVA | ВРА-STI |
| антитела Kip 28/4 | | | |
| $K_A \times 10^{-8}, M^{-1}$ | 148.0 | 39.1 | 37.3 |
| $*K_A \times 10^{-8}, M^{-1}$ | 146.7 | 37.6 | 36.2 |
| антитела An-HPVA | | | |
| $K_A \times 10^{-8}, M^{-1}$ | 10.8 | 3.7 | 1.2 |
| $*K_A \times 10^{-8}, M^{-1}$ | 9.8 | 3.1 | 1.0 |

Сопоставление значений констант аффинности K_A и $*K_A$, полученных для антител связанных с полистирольными частицами и свободных антител, показало, что они практически равны. Это свидетельствует о том, что все активные сайты связывания доступны для взаимодействия с гаптен-белковым конъюгатом, закрепленным на поверхности электродов пьезокварцевого иммуносенсора.

Специфичность применяемых антител также не изменяется при конъюгации их с наночастицами полистирольного латекса (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициенты кросс-реактивности (CR, %) антител к бисфенолу А и родственными соединениям

| Тестируемое соединение | Антитела | | | |
|--|----------|-----------|---------|----------|
| | Kip 28/4 | Kip 28/4* | An-HPVA | An-HPVA* |
| ВРА | 100 | 100 | 100 | 100 |
| ВРА - COOH (2-(<i>n</i> -гидроксифенил),2-(<i>n</i> -карбоксифенил)пропан) | 120 | 121 | 105 | 102 |
| Ph (фенол) | 3.6 | 3.4 | 5.0 | 5.1 |
| 4-NPh (4-нитрофенол) | 2.1 | 2.1 | 2.3 | 2.4 |
| 4-KR (крезол) | 1.8 | 1.9 | 2.0 | 1.9 |
| BZ (бензидин) | 4.7 | 5.0 | 6.0 | 5.8 |

Применяемые антитела характеризуется высокой специфичностью, и позволяют проводить определение бисфенола А в присутствии родственных соединений, поскольку коэффициенты перекрестного реагирования для фенольных производных не превышают 6%, а большое значение CR% для карбоксильного производного бисфенола А связано с тем, что данное соединение используется при получении иммуногена.

Разработана методика определения бисфенола А с применением наночастиц полистирольного латекса, метрологические характеристики которой приведены в табл. 3. Правильность определения ВРА подтверждена методом «введено - найдено» (табл. 4). Отмечено, что использование полимерных наночастиц позволяет

расширить границы линейного диапазона определяемых содержаний как в область низких, так и высоких концентраций и снизить предел обнаружения.

Таблица 3. Метрологические характеристики методики определения бисфенола А в жидких средах ($P=0,95$, $n=3$)

| Применяемые антитела | C_{min} , нг/мл | Уравнение градуировочной функции | Линейный диапазон, нг/мл | R^2 |
|----------------------|-------------------|----------------------------------|--------------------------|-------|
| Кip 28/4 | 0,5 | $y = -2.6x + 200$ | 1 – 75 | 0.99 |
| An-HPVA | 1,0 | $y = -1.9x + 101$ | 5 – 50 | 0.98 |
| Кip 28/4* | 0,01 | $y = -8.93x + 360.15$ | 0.1-400 | 0.98 |
| An-HPVA* | 0,01 | $y = -13.66x + 340.63$ | 0.1-400 | 0.98 |

* с применением полистирольного латекса с размером частиц 45 нм

Таблица 4. Проверка правильности определения бисфенола А с помощью пьезокварцевого иммуносенсора ($P=0,95$, $n=3$)

| Введено, нг/мл | Найдено, нг/мл | S_r |
|----------------|-----------------|-------|
| 5.0 | 5.1 ± 0.1 | 0.01 |
| 125.0 | 125.1 ± 0.1 | 0.01 |
| 400.0 | 402.1 ± 0.1 | 0.02 |

Иммобилизация антигенов на поверхности сенсора и последующее взаимодействие их с антителами, соединенными с частицами латекса, позволит существенно повысить аналитический сигнал сенсора и чувствительность определения, снизить предел обнаружения высоко- и низкомолекулярных соединений. В работе, на примере определения низкомолекулярного бисфенола А (ВРА) в жидких средах, показана возможность применения наночастиц полистирольного латекса для усиления сигнала пьезокварцевого сенсора.

Сенсор апробирован при проточно-инжекционном определении ВРА в природных водах (р. Воронеж). Анализ природных вод осуществляли без предварительной пробоподготовки. Установлено, что во всех анализируемых образцах содержание ВРА не превышает ПДК установленных для природных водоемов.

Список литературы

1. Ермолаева Т.Н., Дергунова Е.С., Еремин Е.С. Проточно-инжекционное определение нонилфенола в жидких средах с помощью пьезокварцевого иммуносенсора // ЖАХ, 2006, Т. 61, № 6, С. 660-665.
2. Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н. Применение золотых наночастиц для усиления сигнала пьезокварцевого иммуносенсора // Заводская лаборатория. 2010. №3. С. 37-40.
3. Генералова А. Н., Буряков А. Н., Лукин Ю. В., Зубов В. П. Турбидиметрические исследования реакции латексной агглютинации при определении 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты // Биоорг. Химия, 2000, Т. 26, № 7, С. 548-553
4. Мелихова Е.В., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Оценка методов иммобилизации иммунореагентов на поверхности пьезокварцевых иммуносенсоров

для определения сульфопрепаратов в жидких средах. // Сорбционные и хроматографические процессы, 2006 г., том 6, вып. 1, С. 99-107.

5.Калмыкова Е.Н., Милонов М.В., Мелихова Е.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Пьезокварцевый иммуносенсор для проточного определения сульфопрепаратов в жидкостях// Сенсор, 2005, № 2, С. 14-20.

6.Башкатов Т.В., Жигалин Я. Л. Технология синтетических каучуков//Л.: Химия, 1987. – 360 с.

7.Shipway A.N. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Application/ A.N. Shipway, E.Katz and I. Willer. – Chemphyschem – 2000. – V.1 – P. 18-52.

8.Bruno De Meulenaer, K. Baert, H. Lanckriet, V. Van Hoed, A. Huyghebaert. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol A using chicken immunoglobulins// J. Agric. Food Chem., 2002, Vol. 50(19), pp. 5273-5282.

9.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. № 5. С. 597–605.

Дергунова Елена Сергеевна – к.х.н., доцент, кафедра химии ЛГТУ, Липецк, тел. +7 4742 328131

Мухортова Дарья Валерьевна – студент 3-го курса химико-металлургического факультета ЛГТУ, Липецк

Ермолаева Татьяна Николаевна – профессор, д.х.н., профессор кафедры химии ЛГТУ, Липецк

Dergunova Yelena S. - k.kh.n., assistant professor of the chair of chemistry Lipetsk State Technical University, Lipetsk, e-mail: dergunova14@yandex.ru

Muhortova Daria V. – student, 3d year of studies, the chair of chemistry Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. - d.kh.n., professor of the chair of chemistry Lipetsk State Technical University, Lipetsk