

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова, Е. С. Графические методы в практической психологии / Е.С. Романова. – М.: Аспектпресс, 2011. – 400 с.
2. Столяренко, Л. Д. Основы психологии / Л.Д. Столяренко. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1997. – 736 с.
3. Манцветова, А. И., Орлова, В. Ф., Славуцкая, И. А. Теоретические (естественнонаучные) основы судебного почерковедения / А.И. Манцветова, В.Ф. Орлова, И.А. Славуцкая. – 2-е изд. – М., 2006. – 444 с.
4. Курьшикина, Т. Ю., Коцуба, А. Е. Отражение психического состояния в рукописном тексте: тревожность и ее маркеры / Т.Ю. Курьшикина, А.Е. Коцуба // Вестник молодых ученых и специалистов Самарского государственного университета. – 2014. – № 1. – С. 59–63.
5. Фейгенберг, И. М. Николай Бернштейн: от рефлекса к модели будущего / И.М. Фейгенберг. – Москва: Смысл, 2004.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ В ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЛАЗМОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE USAGE OF POLYELECTROLYTES IN AN IMMUNO-FLUORESCENT ANALYSIS USING PLASMONIC SILVER NANOPARTICLES

**И. В. Коктыш¹, Я. И. Мельникова¹, К. И. Майорова¹,
О. С. Кулакович², А. А. Романенко², С. А. Маскевич¹**
**I. Koktysh¹, Y. Melnikova¹, K. Maiorova¹,
O. Kulakovich², A. Ramanenka², S. Maskevich¹**

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь ²Институт физики им. Степанова НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

¹Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²B.I.Stepanov Institute of Physics, Minsk, Republic of Belarus

Проанализировано влияние вида и физико-химической природы различных полиэлектролитов, используемых при создании пленок из наночастиц серебра, на параметры взаимодействия компонентов иммунохимической тест-системы для определения простат-специфического антигена с применением плазмонного усиления флуоресценции моноклональных антител, меченных изотиоцианатом флуоресцеина. Установлено, что покрытие нанотекстурированной пленки серебра поли-L-лизином приводит к усилению регистрируемого сигнала на 10-15%, а использование сильнозаряженного поликатионного полиэлектролита, полидиаллилдиметиламмония хлорида – на 20-30%. Физико-химические свойства полиэлектролита на пленках из наночастиц серебра могут оказывать значительное влияние на сорбционную емкость твердой фазы и на конформационное состояние и стабильность иммобилизуемых белковых молекул.

The influence of the type and physicochemical nature of various polyelectrolytes used to create films of silver nanoparticles on the interaction parameters of the components of the immunochemical test system for determining the prostate serum antigen using plasmon fluorescence enhancement of FITC-labeled monoclonal antibodies has been analyzed. It was found that coating silver nanofilms with poly-L-lysine leads to an increase in the recorded signal by 10-15%, and the use of a highly charged polycationic polyelectrolyte polydiallyldimethylammonium chloride increases the signal by 20-30%. The physicochemical properties of the polyelectrolyte on silver nanoparticle films can have a significant effect on the sorption capacity of the solid phase and on the conformational state and stability of immobilized protein molecules.

Ключевые слова: иммунофлуоресценция, поли-L-лизин, полидиаллилдиметиламмоний хлорид, изотиоцианат флуоресцеина, плазмоники, простат-специфический антиген.

Key words: immunofluorescence, poly-L-lysine, polydiallyldimethylammonium chloride, fluorescein isothiocyanate, plasmonics, prostate-specific antigen.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-218-221>

Одной из наиболее важных и актуальных задач, решаемых современной аналитической биотехнологией, является разработка новых методических подходов и инструментов, позволяющих осуществлять экспресс-анализ различных по своей природе соединений в биологических жидкостях или в объектах окружающей среды.

Основными требованиями, которые предъявляются к подобным методологическим разработкам, являются высокая чувствительность, воспроизводимость результатов, достаточная простота выполнения, относительно низкая стоимость и возможность проведения анализа в максимально короткие сроки.

Основные принципы функционирования подобных биоаналитических систем заключаются в следующем: на первом этапе анализа происходит первоначальное «распознавание» анализируемого вещества в растворе, осуществляемое за счет эффективных специфических взаимодействий, а затем биофизические и биохимические преобразования молекул в реакционной системе, приводящие к визуализации продукта реакции.

Образующиеся комплексы биоаналитических молекул с анализируемым веществом могут быть обнаружены визуально, в этом случае один из компонентов системы конъюгируется с ферментативной меткой, или детекция может осуществляться с применением соответствующего спектрального инструментального оборудования, в этом случае в качестве метки используются вещества, обладающие люминесцентными, флуоресцентными или иными спектральными свойствами.

В настоящее время наночастицы металлов, в частности золота и серебра и их композиты широко используются как эффективные оптические преобразователи разнообразных биоспецифических взаимодействий. Это обеспечивается сочетанными явлениями плазмонного резонанса, присущего наночастицам, и флуоресценции, свойственной кластерным соединениям. Количественная оценка меченых комплексов позволяет вычислять точную концентрацию анализируемого соединения в пробе с использованием калибровочных кривых.

Подобные методические подходы представляют большой интерес для современной биологии (определение биологических макромолекул и метаболитов), медицины (диагностика заболеваний, фармакологический скрининг и мониторинг, оценка эффективности лечения) и экологии (экспресс-мониторинг окружающей среды, количественный анализ контаминантов, оценка эффективности процессов очистки и биодegradации).

Иммунологический анализ с использованием флуоресцентных методов детекции обладает многими преимуществами по сравнению с широко распространенным в медицинской и биоаналитической практике иммуферментным методом анализа. Использование флуорофоров для конъюгирования с антителами или антигенами позволяет создавать различные по конструкции биоаналитические тест системы, которые могут быть использованы как для качественного, так и для количественного определения различных веществ. При этом для флуоресцентных меток чувствительность и динамический диапазон определяемых концентраций биоаналита в среднем на 1–2 порядка выше, чем при использовании фотометрических меток.

Количественная иммунодиагностика биологических микро- и макромолекул развивается в направлении минимизации объемов исследуемых образцов, количества расходуемых реагентов и снижения уровня достоверно определяемых концентраций аналита до нано- и пикограммовых количеств. Существующие структурно-функциональные ограничения морфологии молекулы антитела не позволяют достичь этих целей только путем совершенствования пространственной организации молекул методами генной инженерии и биотехнологии. В этих условиях повышение чувствительности иммуноанализа может быть достигнуто с помощью совершенствования методов детекции и методов усиления сигнала с использованием современных нанотехнологических подходов.

Одним из наиболее перспективных методов повышения чувствительности иммунофлуоресцентного анализа является плазмонно-усиленная флуоресценция. В зависимости от начального квантового выхода флуоресценции используемой флуоресцентной метки (флуорофора), интенсивность регистрируемого сигнала может быть повышена в 10–100 раз при помещении флуорофора вблизи металлических наночастиц, как правило, золота или серебра [1]. Ранее нами продемонстрирована возможность получения усиленной флуоресценции для модельных биомолекул: бычьего сывороточного альбумина, меченого флуоресцеином изотиоцианатом (далее – ФИТЦ) и иммуноглобулина G человека, меченого ФИТЦ, осажденных на нанотекстурированную серебряную поверхность [2,3].

Аналогичные эффекты были зарегистрированы и при использовании пленки из наночастиц серебра в качестве подложки для иммунологических тест-систем, сконструированных в рамках двуцентрового «сэндвич»-анализа с использованием пары неконкурирующих моноклональных антител для определения альфа-фета протеина [4]. При этом наночастицы серебра электростатически осаждались на поверхность лунок полистирольных планшетов, широко используемых в иммунологическом анализе, с помощью полиэлектролитных слоев и фиксация молекул антител на поверхности серебряной нанопленки также происходила с помощью полиэлектролитов.

Цель настоящего исследования – провести сравнительный анализ влияния различных полиэлектролитов на параметры взаимодействия компонентов иммунохимической тест-системы для определения простат-специфического антигена и оценить вклад различных полиэлектролитов в процесс усиления сигнала в анализируемой тест-системе с применением плазмонно усиленной флуоресценции.

Использовался двуцентровый иммунофлуоресцентный анализ связывания ПСА с мышинными моноклональными антителами: моноклональные антитела, специфичные к ПСА, сенсibilизированные на твердой фазе (МАТ1, №10184, Abcam, США) и моноклональные антитела, специфичные к ПСА и меченные ФИТЦ (антиПСА-ФИТЦ, №178776, Abcam, США). Эксперименты проводились в 96-луночных полистироловых планшетах. В качестве полиэлектролитов при создании пленок из наночастиц серебра применяли полидиаллилдиметиламмоний хлорид (далее – ПДАДМАХ) и поли-L-лизин гидробромид (Sigma, США).

Золь серебра был синтезирован по методу цитратного восстановления нитрата серебра. Серебряные наночастицы осаждали в лунки планшета по следующей схеме: 100 мкл раствора ПДАДМАХ (10 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) выдерживались в половине лунок планшета в течение 20 мин; затем 100 мкл золя серебра выдерживались

в половине лунок планшета в течение 24 ч при комнатной температуре; на последнем этапе 100 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) или раствора поли-L-лизина (20 мкг/мл) выдерживались во всех лунках планшета в течение 20 мин.

В лунки планшетов с предварительно иммобилизованным моноклональным антителом МАТ1 добавляли возрастающие количества ПСА (0 нг/мл, 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл, 15 нг/мл, 30 нг/мл). После инкубации при +37 °С и удаления несвязавшихся реагентов вносили анти ПСА-ФИТЦ. По окончании инкубации в темноте при +37 °С планшет промывали и проводили измерения флуоресценции (возбуждение: 460 нм, эмиссия: 518 нм). Статистическая обработка полученных данных и построение калибровочных графиков осуществлялась в Microsoft Office Excel.

В исследованиях, проведенных ранее, было установлено, что по данным электронной микроскопии наночастиц серебра и атомно-силовой микроскопии, поверхность серебряных пленок, полученных осаждением наночастиц серебра на ПДАДМАХ-модифицированную полистирольную подложку, представляет собой сплошной слой сферических наночастиц размером 30–80 нм. Кроме этого, было установлено, что максимальное усиление флуоресценции наблюдается при расстоянии между биомолекулами и наночастицами серебра, соответствующем 1–3 полиэлектролитным слоям (1,4–3,3 нм) [1-4].

На основании этих данных в лунках полистирольного планшета, покрытых наночастицами серебра, был использован только один слой полиэлектролита (ПДАДМАХ или поли-лизин) для адсорбции первого компонента иммунохимической тест-системы МАТ1, так как дальнейшее формирование комплекса «МАТ1-ПСА-антиПСА-ФИТЦ», должно было привести к увеличению расстояния между наночастицами серебра и флуоресцентными метками.

Для сравнительного анализа влияния двух полиэлектролитов на процессы белковой адсорбции и формирования иммунных комплексов, иммунохимическая тест-система была помещена в лунки полистирольного планшета, обработанные разными способами: покрытые поли-лизин, покрытые ПДАДМАХ, покрытые комплексом «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-поли-L-лизин», покрытые комплексом «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-ПДАДМАХ». В качестве контроля был использован стандартный вариант проведения иммуноанализа с иммобилизацией МАТ1 на интактной поверхности полистирола в ячейках планшета.

Как видно из представленных результатов, проведение анализа в лунках полистирольного планшета, покрытых поли-L-лизин, приводит к увеличению интенсивности флуоресценции на 10-17 % по сравнению с контролем (Рис.).

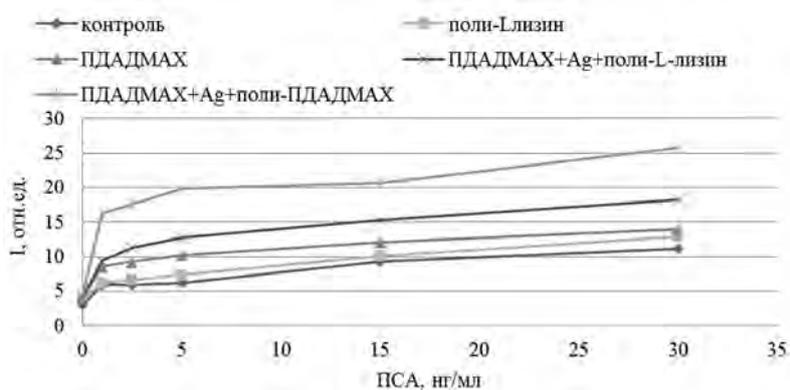


Рисунок – Влияние полиэлектролитов и плазмонных серебряных частиц на чувствительность иммунофлуоресценции при детекции ПСА

Поли-L-лизин является положительно заряженным гомополимером и слабым полиэлектролитом, что обусловлено строением его мономера – аминокислоты лизина. Положительный заряд делает возможным его использование для формирования различного рода полиэлектролитных комплексов. Иммобилизованные на полистироле молекулы поли-L-лизина связываются с молекулами моноклонального МАТ1 путем образования множественных электростатических и водородных связей, образуя заряженные «петли» и «хвосты» вокруг поверхности белка. Таким образом, происходит не только фиксация белковой молекулы на поверхности полиэлектролита, но и стабилизация структуры белка, что также вносит свой положительный вклад в образование комплекса МАТ1-ПСА и способствует увеличению регистрируемого сигнала.

Использование в качестве подложки для иммунохимической тест-системы слоя другого полиэлектролита-полидиаллилдиметиламмония хлорида ПДАДМАХ увеличивает интенсивность флуоресценции на 30-45% по сравнению с контролем (Рис.).

Молекула полидиаллилдиметиламмония хлорида ПДАДМАХ представляет собой высокомолекулярный сильнозаряженный полимер, содержащий большое количество заряженных групп и имеющий пространственно нелинейный характер. Из литературных данных известно, что при низких концентрациях и при добавлении солей (что соответствует условиям нашего эксперимента) макромолекулы ПДАДМАХ образуют множественные петли и формируют структуры, похожие на клубки [5]. В результате образуется

вы-сокозаряженная и пространственно неплоская поверхность, которая создает благоприятные условия для связывания белковых макромолекул (в нашем случае молекул МАТ1). Стабильность комплексов «ПДАДМАХ-белок» поддерживается множественными электростатическими и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, а также системой водородных связей, что может приводить к изменению конформации иммобилизованных молекул антител, не только стабилизируя комплекс, но и способствуя увеличению констант связывания антигена в антигенсвязывающих центрах антител. Можно предположить, что увеличение интенсивности флуоресценции, свидетельствующее о возрастании количества связанных моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ с комплексом МАТ1-ПСА на твердой фазе, является результатом как повышения сорбционной способности твердой фазы благодаря наличию слоя ПДАДМАХ, так и увеличения конформационной стабильности образующихся комплексов «антиген-антитело».

Проведение иммуноанализа в лунках, покрытых комплексом «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-поли-L-лизин», продемонстрировало увеличение флуоресцентного сигнала в 1,6-1,9 раза по сравнению с контролем и в 1,7 раза по сравнению с эффективностью флуоресцентного сигнала при иммобилизации МАТ1 и проведении анализа на твердой фазе, покрытой поли-L-лизином (Рис.).

Данный результат свидетельствует о большом вкладе феномена плазмонного резонанса серебряной нанопленки со спектром поглощения антиПСА-ФИТЦ, что приводит к усиленной флуоресценции последне-го. Наличие полиэлектролитного слоя поли-L-лизина обеспечивает некоторое увеличение количества молекул МАТ1 на подложке, что повышает общую чувствительность анализа, но не является ведущим фактором в этом процессе.

Использование в качестве подложки комплекса «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-ПДАДМАХ» показало максимальный эффект усиления интенсивности флуоресценции (рис.). При этом величина сигнала возрастает в 2,3-2,7 раза по сравнению с величиной сигнала, полученной при иммобилизации тест-системы на необработанном полистироле и в 1,8-1,9 раз по сравнению с величиной сигнала, полученной при иммобилизации тест-системы на твердой фазе, покрытой ПДАДМАХ.

Таким образом, наблюдается сочетанное действие двух параллельных процессов: с одной стороны, происходит плазмонное усиление флуоресценции флуорофора антиПСА-ФИТЦ с помощью наночастиц серебра, а с другой стороны интенсивность сигнала возрастает не менее чем на 20 процентов за счет увеличения количества молекул МАТ1, связанных с поверхностью полиэлектролита ПДАДМАХ. Данный эффект интересен еще и тем, что иммобилизация молекул антител на сильнозаряженной поверхности полиэлектролита ПДАДМАХ может изменять их антигенсвязывающие свойства за счет увеличения конформационной подвижности как константных, так и переменных доменов, что создает благоприятные условия для формирования пространственно-комплементарных белковых поверхностей.

При конструировании различных иммунохимических тест-систем на пленках из наночастиц серебра, существенным является выбор полиэлектролита, которым покрывается подобная нанопленка, так как физико-химические свойства полиэлектролита могут оказывать значительное влияние на сорбционную емкость твердой фазы и на конформационное состояние и стабильность иммобилизуемых белковых молекул. От этих параметров будет в значительной степени зависеть как чувствительность, так и специфичность иммунохимической тест-системы, а, следовательно, и эффективность всего анализа.

В использованных нами вариантах комбинации различных полиэлектролитов с пленками из наночастиц серебра наилучшими сорбционными и физико-химическими свойствами обладал комплекс «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-ПДАДМАХ».

Уточнение молекулярных механизмов и особенностей взаимодействия «полиэлектролит-белок» требует дальнейшего исследования и дополнительных экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kulakovich, O.* Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence / O. Kulakovich [et al.] // *Nanotechnology*. – 2006. – Vol. 17, № 20. – P. 5201–5206.
2. *Guzatov, D. V.* Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticles: theory, modeling, and experiment / D. V. Guzatov [et al.] // *J. Phys. Chem. C*. – 2012. – Vol. 116, № 19. – P. 10723–10733.
3. *Романенко, А. А.* Плазмонное усиление люминесценции конъюгатов изотиоцианата флуоресцеина и иммуноглобулина человека / А. А. Романенко [и др.] // *ЖПС*. – 2014. – Т. 81, № 2. – С. 228–232.
4. *Ващенко, С. В.* Повышение чувствительности флуоресцентного иммунологического анализа альфа-фетопротеина с помощью плазмонных серебряных наночастиц / С. В. Ващенко [и др.] // *Вестник БГУ. Серия 1. Физика. Математика. Информатика*. – 2014. – № 3. – С.46–51.
5. *Есакова, А. С.* Диффузия полидиаллилдиметиламмоний хлорида в водных растворах с добавленной солью / А.С. Есакова, Т.В. Лаптинская, Е.А. Литманович // *ВМУ. Серия 3. Физика. Астрономия*. – 2010. – № 2. – С.5–56.