

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ПЛАЗМОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ<sup>1</sup>

И. В. КОКТЫШ<sup>1</sup>), Я. И. МЕЛЬНИКОВА<sup>1</sup>),  
О. С. КУЛАКОВИЧ<sup>2</sup>), А. А. РОМАНЕНКО<sup>2</sup>), С. А. МАСКЕВИЧ<sup>1</sup>)

<sup>1</sup>Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,  
ул. Долгобродская, 23, корп. 1, 220070, г. Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси,  
пр. Независимости, 68, корп. 2, 220072, г. Минск, Беларусь

Изучена зависимость основных параметров взаимодействия компонентов иммунофлуоресцентной тест-системы для количественного определения простатспецифического антигена на основе плазмонных серебряных наночастиц от физико-химической природы различных полиэлектролитов, применяемых при покрытии пленок из наночастиц серебра. Показано, что использование слабозаряженного поликатионного электролита поли-L-лизина позволяет повысить показатели антигенного связывания тест-системы в 2,34 раза, а применение сильнозаряженного поликатионного электролита полидиаллилдиметиламмония хлорида вызывает увеличение параметров аффинности связывания простатспецифического антигена в 5 раз. При разработке различных иммунохимических тест-систем с использованием пленок из наночастиц серебра важное значение имеет выбор полиэлектролита для покрытия нанослоя серебра, так как физико-химические и электростатические свойства полиэлектролита могут оказывать существенное влияние как на сорбционную емкость твердой фазы, так и на конформационное состояние и функциональную активность иммобилизуемых белковых молекул. От этих параметров в значительной степени зависит как специфичность, так и чувствительность иммунохимической тест-системы, а также минимально возможные обнаруживаемые концентрации биоаналита.

<sup>1</sup>Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

### Образец цитирования:

Коктыш ИВ, Мельникова ЯИ, Кулакович ОС, Романенко АА, Маскевич СА. Влияние полиэлектролитов на увеличение чувствительности иммунофлуоресцентного анализа на основе плазмонных серебряных наночастиц. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020; 3:72–80.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-72-80>

### For citation:

Koktysh IV, Mel'nikova YaI, Kulakovich OS, Ramanenka AA, Maskevich SA. Influence of polyelectrolytes on increasing sensitivity of immunofluorescent analysis based on plasmon silver nanoparticles. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;3:72–80. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-72-80>

### Авторы:

**Ирина Владимировна Коктыш** – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией экологической биотехнологии.

**Янина Игоревна Мельникова** – старший преподаватель кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

**Ольга Сергеевна Кулакович** – кандидат химических наук; заместитель заведующего центром «Нанопотоника».

**Андрей Алексеевич Романенко** – научный сотрудник центра «Нанопотоника».

**Сергей Александрович Маскевич** – доктор физико-математических наук, профессор; директор.

### Authors:

**Irina V. Koktysh**, PhD (biology); head of the laboratory of environmental biotechnology.

[drkoktysh@gmail.com](mailto:drkoktysh@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-3725-8588>

**Yanina I. Mel'nikova**, senior lecturer at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

[univer.yanina@gmail.com](mailto:univer.yanina@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-3887-526X>

**Olga S. Kulakovich**, PhD (chemistry); deputy head of the Nanophotonics Center.

[o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by](mailto:o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by)

<https://orcid.org/0000-0001-8618-6771>

**Andrei A. Ramanenka**, researcher at the Nanophotonics Center.

[a.ramanenka@ifanbel.bas-net.by](mailto:a.ramanenka@ifanbel.bas-net.by)

<https://orcid.org/0000-0002-6336-0578>

**Sergey A. Maskevich**, doctor of science (physics and mathematics), full professor; director.

[sergei.maskevich@gmail.com](mailto:sergei.maskevich@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0001-7644-4968>

**Ключевые слова:** флуоресцентный иммунологический анализ; поли-L-лизин; полидиаллилдиметиламмоний хлорид; флуоресцеин изотиоцианат; наночастицы серебра; плазмоника; простатспецифический антиген.

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках договора Института физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований № Ф20ПТИ-004 от 4 мая 2020 г. (проект «Исследование механизма плазмонного усиления фотолуминесценции в анизотропных наноструктурах»).

## INFLUENCE OF POLYELECTROLYTES ON INCREASING SENSITIVITY OF AN IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS BASED ON PLASMON SILVER NANOPARTICLES

*I. V. KOKTYSH<sup>a</sup>, Ya. I. MEL'NIKOVA<sup>a</sup>,  
O. S. KULAKOVICH<sup>b</sup>, A. A. RAMANENKA<sup>b</sup>, S. A. MASKEVICH<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,  
23 Daŭhabrodskaja Street, 1 building, Minsk 220070, Belarus*

*<sup>b</sup>B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus,  
68 Niezaliežnasci Avenue, 2 building, Minsk 220072, Belarus*

*Corresponding author: Ya. I. Mel'nikova (univer.yanina@gmail.com)*

It was studied the dependence of the interaction of the components of the immunofluorescence test system for the quantitative determination of prostate specific antigen based on plasmon silver nanoparticles on the physicochemical nature of various polyelectrolytes used to coat films of silver nanoparticles. It has been shown that the use of a weakly charged polycationic polyelectrolyte poly-L-lysine can increase the antigenic binding of the test system by 2.34 times, and the use of a highly charged polycationic polyelectrolyte polydiallyldimethylammonium chloride increases the binding affinity of prostatic specific antigen by 5 times. When developing various immunochemical test systems using films of silver nanoparticles, an important parameter is the choice of a polyelectrolyte for coating a silver nanolayer, since the physicochemical and electrostatic properties of the polyelectrolyte can significantly affect both the sorption capacity of the solid phase and the conformational state functional activity of immobilized protein molecules. Both specificity and sensitivity of the immunochemical test system, as well as the minimum possible detectable concentration of bioanalyte, largely depend on these parameters.

**Keywords:** fluorescence immunological analysis; polyelectrolytes; poly-L-lysine; polydiallyldimethylammonium chloride; fluorescein isothiocyanate; fluorescence; silver nanoparticles; plasmonics; prostate-specific antigen.

**Acknowledgements.** The study was conducted within agreement of B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, with the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research No. F20PTI-004 dated 2020 May 4 (the project «Investigation of the mechanism of plasmon accumulation of photoluminescence in anisotropic nanostructures»).

### Введение

Простатспецифический антиген (ПСА) в норме является компонентом простатического секрета и семенной жидкости и вырабатывается люминальными эпителиальными тканями простаты. Благодаря механизмам межтканевой диффузии некоторая его часть попадает в кровоток, так что среднее содержание этого белка в сыворотке крови у мужчин колеблется от 1 до 4 нг [1–3]. Данное значение может варьироваться в зависимости от возраста, физической нагрузки и индивидуальных физиологических особенностей [4–6].

Кроме этого, ПСА был обнаружен и в непростатических тканях, таких как секреторные эпителиальные клетки трахеи, щитовидной железы, слюнных желез, тощей и подвздошной кишки, поджелудочной железы [7–9]. Достаточно высокое содержание ПСА отмечено и у женщин в тканях эндометрия, плаценты, молочной железы, а также в грудном молоке и амниотической жидкости [10; 11], что свидетельствует о том, что данный белок вовлечен во многие физиологические процессы и его функция в человеческом организме не ограничивается только поддержанием агрегатного состояния спермы у мужчин.

При развитии патологических процессов, особенно неопластического характера, происходит повышение уровня ПСА в сыворотке крови, и это является диагностическим критерием в первую очередь рака предстательной железы у мужчин, а при установленном диагнозе «рак» отражает распространенность и стадийность опухолевого процесса [1–3; 5]. Относительно недавно обнаружено, что ПСА может

экспрессироваться различными солидными образованиями [11]. Присутствие ПСА в тканях было отмечено при почечно-клеточном раке (в том числе и у женщин), немелкоклеточном раке легких у мужчин и женщин, опухолях нервной системы, надпочечников, толстой кишки, слюнных и потовых желез, в онкоцитомах околоушных желез [2; 3; 6; 7; 11]. Наибольший интерес представляют публикации, посвященные исследованиям уровня ПСА при раке молочной железы [6; 9; 11].

Аналитическая биотехнология дает возможность разрабатывать новые экспериментальные подходы к созданию высокочувствительных методов анализа биологически активных соединений, позволяющих достоверно определять нано- и пикограммовые количества вещества в биологических жидкостях или объектах окружающей среды.

Применение спектрального инструментального оборудования обеспечивает эффективную детекцию биоаналитов. В этом случае в качестве метки используются вещества, обладающие люминесцентными, флуоресцентными или иными спектральными свойствами. В роли оптических преобразователей разнообразных биоспецифических взаимодействий выступают наночастицы металлов, таких как золото и серебро, что позволяет сочетать в одной экспериментальной системе явления плазмонного резонанса и флуоресценции.

Иммуноаналитическое количественное определение белковых молекул с применением флуорохромов для конъюгирования с антителами или антигенами обладает чувствительностью на один-два порядка выше, чем при использовании фотометрических меток.

Для исследования возможности применения ПСА в качестве биомаркера непростатических раков требуется увеличение чувствительности существующих иммунохимических тест-систем.

Цель настоящей работы – изучить влияние различных полиэлектролитов на чувствительность иммунофлуоресцентного анализа ПСА на основе плазмонных серебряных наночастиц.

## Материалы и методы исследования

**Применяемые материалы.** В работе использовались следующие химические реактивы: нитрат серебра, цитрат натрия, полиэлектролит полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ), поли-L-лизин гидробромид, флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ, изомер I), хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА) (все реактивы производства компании *Sigma-Aldrich*, США), буферный раствор Tris-EDTA с pH 7,6 (*Fisher BioReagents*, США), 10 ммоль/л калий-натрий-фосфатный буфер (ФСБ), содержащий 140 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), и стандарты ПСА, соответствующие концентрациям 0; 1; 2,5; 5; 15 и 30 нг/мл (ООО «АнализМедПром», Беларусь), неконкурирующие моноклональные антитела к ПСА антиПСА-MAT1 и антиПСА-MAT2 (*Abcam*, Великобритания).

Эксперименты проводились в прозрачных 96-луночных полистироловых планшетах для иммуноанализа (ОАО «Медполимер», Россия) с объемом лунки 250 мкл.

**Получение конъюгатов моноклональных антител.** Синтез конъюгатов моноклональных антител антиПСА-MAT2 и ФИТЦ (далее – антиПСА-ФИТЦ) осуществлялся по стандартной методике [4], концентрация исходного раствора была 2,97 мг/мл с молярным соотношением белка и ФИТЦ 1,0 : 3,9.

**Формирование пленки наночастиц серебра.** Золь серебра был синтезирован по методу цитратного восстановления нитрата серебра [12; 13]. Электронные снимки полученных серебряных наночастиц были сделаны на сканирующем электронном микроскопе SU 8030 (*Hitachi*, Япония). Образцы для электронной микроскопии готовили путем нанесения капли золя серебра на кремниевую подложку и последующего высушивания на воздухе.

Серебряные наночастицы осаждали в лунки планшета по следующей схеме:

- 1) 150 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) выдерживались в половине лунок планшета в течение 20 мин;
- 2) 150 мкл золя серебра выдерживались в половине лунок планшета в течение 24 ч при комнатной температуре.

**Формирование слоев полиэлектролитов на серебряной нанопленке.** На поверхность пленки, состоящей из наночастиц серебра, наносили 150 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) или раствора поли-L-лизина (20 мкг/мл) по отдельности либо чередовали слои этих двух полиэлектролитов. Растворы ПДАДМАХ и поли-L-лизина инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Каждый этап процедуры заканчивался промывкой дистиллированной водой.

**Формирование слоев полиэлектролитов на поверхности полистирола.** Обработка полистироловых планшетов растворами полиэлектролитов осуществлялась путем инкубирования 150 мкл раствора поли-L-лизина (20 мкг/мл) или раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) на ячейку в течение 20 мин при комнатной температуре. Каждый этап процедуры заканчивался промывкой дистиллированной водой.

**Иммобилизация антиПСА-MAT1 на твердой фазе.** В лунки полистироловых планшетов (интактных или покрытых комплексами, состоящими из нанопленки серебра и полиэлектролитов в различных сочетаниях) вносили антиПСА-MAT1 в количестве 3 мкг на 1 лунку в 150 мкл 10 ммоль/л калий-натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) и инкубировали 16 ч при 4 °С. Затем планшеты промывали тем же буфером и добавляли 1 % раствор БСА в ФСБ. Через 1 ч планшеты промывали ФСБ и использовали в анализе.

**Двухцентровый анализ связывания ПСА с моноклональными антителами.** В лунки полистироловых планшетов с предварительно иммобилизованным моноклональным антителом антиПСА-MAT1 добавляли возрастающие количества ПСА (от 0 до 30 нг/мл соответственно) в ФСБ-БСА в объеме 150 мкл. Инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °С, дважды промывали ФСБ и вносили по 300 нг конъюгата антиПСА-ФИТЦ в объеме 150 мкл. Через 1,5 ч инкубации при 37 °С в темноте лунки промывали ФСБ и измеряли интенсивность флуоресценции (возбуждение 460 нм, эмиссия 518 нм).

Константы взаимодействия конъюгата моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ с комплексом антиПСА-MAT1 – ПСА, фиксированным на полистироле или нанопленках серебра, покрытых различными полиэлектролитами, определяли посредством множественного регрессионного анализа.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ *Statistica 8.0* (*StatSoft Inc.*, США) для Windows с использованием параметрических критериев. При сравнении независимых выборок применяли дисперсионный анализ и *t*-критерий Стьюдента. Для определения вида взаимосвязи признаков использовали множественный регрессионный анализ. В целях выявления статистически значимых различий или взаимосвязи признаков критический уровень значимости *p* нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

## Результаты и их обсуждение

Плазмонно-усиленная флуоресценция является одним из наиболее перспективных методов повышения чувствительности флуоресцентного иммунологического анализа. Интенсивность регистрируемого сигнала может быть увеличена в 10–100 раз, если флуоресцентная метка (флуорофор) размещается на определенном расстоянии от металлических наночастиц золота или серебра [12–14]. Большое значение при этом имеет начальный квантовый выход флуоресценции используемого флуорофора [15; 16].

Ранее в работах группы исследователей под руководством академика НАН Беларуси, доктора физико-математических наук, профессора С. В. Гапоненко была продемонстрирована возможность получения усиленной флуоресценции для модельных биомолекул БСА-ФИТЦ (бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцеином изотиоцианатом) и иммуноглобулина G-ФИТЦ (иммуноглобулина G человека, меченного флуоресцеином изотиоцианатом), осажденных на нанотекстурированную серебряную поверхность [13–15].

Аналогичные эффекты были зарегистрированы и в случае применения пленки из наночастиц серебра в качестве подложки для иммунологической тест-системы, сконструированной в рамках двухцентрового «сэндвич»-анализа с использованием пары неконкурирующих моноклональных антител для определения альфа-фетопroteина и ПСА [13; 14].

При этом наночастицы серебра электростатически осаждались на поверхность лунок полистироловых планшетов с помощью полиэлектролитных слоев. Размер осаждаемых наночастиц, по данным электронной микроскопии, составил от 30 до 80 нм (рис. 1). Фиксация моноклональных антител на поверхности серебряной нанопленки происходила с помощью полиэлектролитов.

В спектре оптической плотности посеребренных лунок планшета регистрировался характерный максимум в области 400 нм, связанный с резонансным плазмонным поглощением наночастицами серебра, а также широкая полоса в области 600–800 нм, связанная с поглощением агрегатами серебряных наночастиц. При этом происходило перекрытие полосы плазмонного резонанса серебряной пленки со спектром поглощения конъюгата антиПСА-ФИТЦ, что обеспечивало эффективное возбуждение флуоресценции ФИТЦ и создавало условия для наблюдения усиленной флуоресценции (рис. 2).

Так как для регистрации плазмонного усиления флуоресценции существенным является расстояние между флуорофором и серебряными наночастицами, толщина полиэлектролитных слоев на поверхности серебряной нанопленки, используемых для адсорбции белковых молекул, не должна превышать 1,4–3,3 нм [12–15]. Это пространственное ограничение связано с наличием в применяемой иммунохимической конструкции двух слоев молекул иммуноглобулинов и слоя молекул ПСА, которые обладают достаточно большими размерами.

На основании этих данных в наших экспериментах для иммобилизации первого компонента иммунохимической тест-системы антиПСА-MAT1 мы использовали поверхности полистирола или серебряной нанопленки, покрытые только одним монослоем полиэлектролита (ПДАДМАХ или поли-L-лизин).

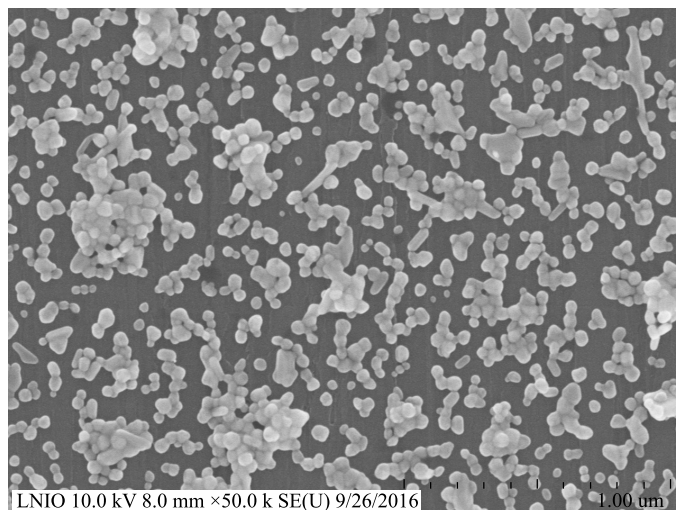


Рис. 1. Изображение серебряных наночастиц, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии

Fig. 1. Image of silver nanoparticles obtained using atomic force scanning electron microscopy

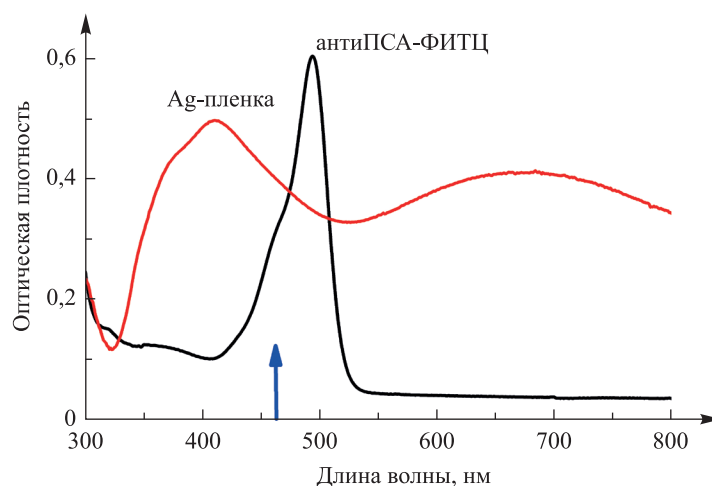


Рис. 2. Спектры оптической плотности пленки серебра и водного раствора антиПСА-ФИТЦ. Стрелкой указана длина волны возбуждающего излучения

Fig. 2. Optical characteristics of an immunochemical test system with plasmon enhancement of PSA-FITC fluorescence by silver nanoparticles. The arrow indicates the wavelength of the exciting radiation

Для изучения вклада монослоя поликатионного электролита в процессы иммобилизации молекул иммуноглобулинов на поверхности полистирола и серебряных нанопленок, а также последующего образования поливалентных иммунных комплексов применялись следующие варианты формирования твердой фазы: полистирол, покрытый поли-L-лизином; полистирол, покрытый ПДАДМАХ; нанопленка серебра, покрытая поли-L-лизином; нанопленка серебра, покрытая ПДАДМАХ.

Контролем являлось проведение иммуноанализа с иммобилизацией антиПСА-MAT1 на интактной поверхности полистирола в ячейках планшета для микроанализа.

Как видно из представленных результатов (рис. 3), при иммобилизации антиПСА-MAT1 в лунках полистиролового планшета, покрытых поли-L-лизином, происходит статистически значимое увеличение констант взаимодействия антиПСА-ФИТЦ с антигеном в 1,2 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), при этом интенсивность флуоресценции возрастает в среднем на 15 % (см. таблицу).

Катионный полиэлектролит поли-L-лизин представляет собой линейный гомополимер, состоящий из последовательно соединенных молекул аминокислоты L-лизина. Наличие множественных катионных групп первичных аминов при иммобилизации данного гомополимера на поверхности полистирола или серебряной нанопленки обеспечивает создание поверхности с неравномерной плотностью электрического заряда. Кроме того, мономеры L-лизина при иммобилизации на твердой фазе в водной

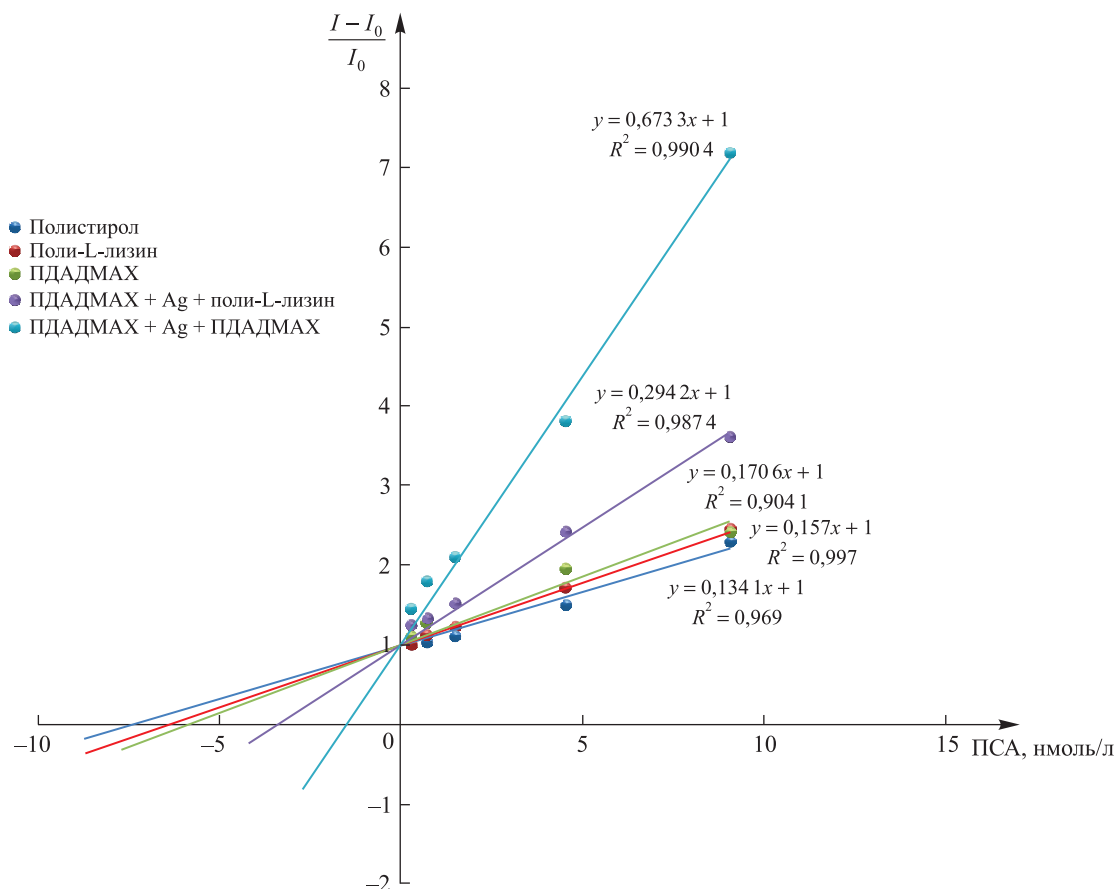


Рис. 3. Определение констант взаимодействия моноклональных антител  
Fig. 3. Determination of the interaction constants of monoclonal antibodies

среде формируют вторичные структуры, которые по строению напоминают  $\beta$ -складки и выступают над поверхностью, образуя заряженные «петли» и «хвосты» [17]. Из литературных данных известно, что процесс иммобилизации белковых макромолекул на поликатионной поверхности определяется в основном суммой электростатических взаимодействий на малых расстояниях, образование водородных связей или гидрофобные взаимодействия не играют решающей роли в этом процессе [18; 19]. С одной стороны, это может приводить к росту количества иммобилизованных молекул, а с другой – к стабилизации белковой структуры, способствуя тем самым увеличению регистрируемого сигнала.

**Значения констант взаимодействия конъюгата моноклонального антитела антиПСА-ФИТЦ с комплексом антиПСА-MAT1 – ПСА, иммобилизованным на различных подложках**  
**The values of the interaction constants of the conjugate of the anti PSA-FITC monoclonal antibody with the anti PSA-MAT1 – PSA complex immobilized on various surfaces**

Вид подложки	Константа взаимодействия, нмоль/л
Полистирол (контроль)	7,5
Полистирол + монослой поли-L-лизина	6,7
Полистирол + монослой ПДАДМАХ	5,8
Нанопленка серебра + монослой поли-L-лизина	3,2
Нанопленка серебра + монослой ПДАДМАХ	1,5

Наши предположения подтвердились результатами экспериментов с иммобилизацией антиПСА-MAT1 на поверхности серебряных нанопленок, покрытых монослоем поли-L-лизина: отмечено статистически значимое возрастание констант взаимодействия конъюгата моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ

с антигеном в 2,34 раза относительно контроля (полистирол) и в 2,1 раза по сравнению с экспериментом ( $p < 0,05$ ), в котором полистирол был покрыт монослоем поли-L-лизина (см. рис. 3, таблицу).

Подобный результат определяется в первую очередь повышением уровня детекции регистрируемого сигнала благодаря наличию плазмонного резонанса серебряной нанопленки со спектром поглощения антиПСА-ФИТЦ. Имобилизация антиПСА-MAT1 на поликатионной поверхности поли-L-лизина привела к возрастанию количества иммобилизовавшихся молекул как на поверхности полистирола, так и на поверхности серебряной нанопленки. Это повысило общую чувствительность анализа, но не может считаться ведущим фактором в данном процессе.

Использование в качестве подложки для иммобилизации антиПСА-MAT1 поверхности полистирола, покрытого слоем ПДАДМАХ, привело к статистически значимому возрастанию констант взаимодействия в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. рис. 3, таблицу).

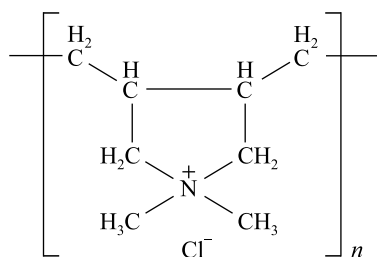


Рис. 4. Структурная организация молекулы ПДАДМАХ

Fig. 4. Structural organization of the PDADMAC molecule

Полиэлектролит ПДАДМАХ представляет собой высокомолекулярный полимер, имеющий пространственно-нелинейный характер и содержащий большое количество заряженных групп благодаря наличию в его структуре пятичленных ароматических колец, включающих четырехвалентный азот (рис. 4).

Согласно литературным данным при средней ионной силе растворителя (что соответствует условиям нашего эксперимента) ПДАДМАХ образует множественные разветвленные антенноподобные цепи и петли, а также формирует структуры, похожие на клубки [20]. При иммобилизации макромолекул ПДАДМАХ на подложке образуется рельефная поверхность с различными выступами, которая обладает высокой плотностью заряда, что создает благоприятные условия для фиксирования молекул иммуноглобулинов (антиПСА-MAT1) [21; 22].

Высокозаряженная поверхность большой площади, с одной стороны, обеспечивает стабильность комплексов ПДАДМАХ – белковая молекула в пространстве, а с другой стороны, может способствовать такому изменению конформации иммобилизованных молекул антител, при котором достигается максимальная аффинность связывания антигенных детерминант в антигенсвязывающих центрах антител, что приводит к увеличению значений констант связывания антигена.

Данные теоретические предположения подтверждаются результатами экспериментов, где в качестве твердой фазы была использована серебряная нанопленка, покрытая монослоем ПДАДМАХ. Константа взаимодействия конъюгата антиПСА-ФИТЦ с антигеном статистически значимо возрастает в 5 раз по сравнению с контролем (полистирол) и в 3,9 раза по сравнению с иммобилизацией антиПСА-MAT1 на поверхности полистирола, покрытого монослоем ПДАДМАХ (см. рис. 3, таблицу).

Очевидно, что подобное увеличение значения константы взаимодействия, свидетельствующее о возрастании количества связанных моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ с комплексом антиПСА-MAT1 – ПСА на твердой фазе, не только является результатом повышения способности твердой фазы связывать молекулы антител благодаря наличию монослоя ПДАДМАХ, но и отражает влияние сильнозаряженного поликатионного электролита на конформационную динамику молекул антител, находящихся в поливалентном комплексе с антигеном.

Следовательно, наблюдается одновременное протекание двух параллельных процессов: с одной стороны, происходит увеличение поверхностной плотности комплексов антиген – антитело на серебряной нанопленке, что, безусловно, повышает чувствительность данной иммунохимической тест-системы, а с другой стороны, этот эффект становится более выраженным благодаря плазмонному усилению флуоресценции флуорофора антиПСА-ФИТЦ с помощью наночастиц серебра.

Данный результат интересен еще и тем, что при связывании молекул антител на сильнозаряженной поверхности катионного полиэлектролита ПДАДМАХ изменяются их антигенсвязывающие свойства за счет увеличения конформационной подвижности как константных, так и переменных доменов иммуноглобулина, что создает благоприятные условия для формирования пространственно-комплементарных белковых поверхностей комплекса антиген – антитело.

## Заключение

При разработке различных иммунохимических тест-систем с использованием пленок из наночастиц серебра важное значение имеет выбор полиэлектролита для покрытия нанослоя серебра, так как физико-химические и электростатические свойства полиэлектролита могут оказывать существенное влияние как на сорбционную емкость твердой фазы, так и на конформационное состояние и функциональную активность иммобилизуемых белковых молекул. От этих параметров в значительной степени

зависит как специфичность, так и чувствительность иммунохимической тест-системы, а также минимально возможные открываемые концентрации биоаналита.

В наших экспериментах наилучшими сорбционными и физико-химическими свойствами обладал комплекс ПДАДМАХ – наночастицы серебра – ПДАДМАХ.

Выяснение молекулярных механизмов взаимодействия полиэлектролит – белок требует дальнейшего исследования и проведения дополнительных экспериментов.

### Библиографические ссылки

1. Ахвледиани НД, Алленов СН, Матюхов ИП. Простатспецифический антиген как маркер заболеваний предстательной железы и мишень для лекарственных препаратов (обзор литературы). *Consilium Medicum*. 2017;19(7):35–40. DOI: 10.26442/2075-1753\_19.7.35-40.
2. Descotes J-L. Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*. 2019;6(2):129–136. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.11.007.
3. Filella X, Foj L. Novel biomarkers for prostate cancer detection and prognosis. In: Schatten H, editor. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*. Cham: Springer; 2018. p. 15–39. (Advances in experimental medicine and biology; volume 1095). DOI: 10.1007/978-3-319-95693-0\_2.
4. Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1784. DOI: 10.3390/ijms17111784.
5. Соловов ВА. Биология простатического специфического антигена и его роль в патогенезе рака простаты. *Вестник Самарского государственного университета. Естественно-научная серия*. 2005;39(5):200–208.
6. Сидоренков АВ, Говоров АВ, Садченко АВ, Пушкарь ДЮ. Диагностическая значимость [-2]proPSA и PHI (обзор литературы). *Онкоурология*. 2014;10(4):87–95. DOI: 10.17650/1726-9776-2014-10-4-87-95.
7. Wu D, Ni J, Beretov J, Cozzi P, Willcox M, Wasinger V, et al. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017;118:15–26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002.
8. Salman JW, Schoots IG, Carlsson SV, Jenster G, Roobol MJ. Prostate specific antigen as a tumor marker in prostate cancer: biochemical and clinical aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015;867:93–114. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0\_7.
9. Понкратов СВ, Хейфец ВХ, Каган ОФ. Диагностическая ценность простатспецифического антигена с учетом возраста пациентов. *Урологические ведомости*. 2016;6(3):30–39. DOI: 10.17816/uroved6330-39.
10. Чибичян МБ, Черногубова ЕА, Коган МИ. Новые биохимические маркеры рецидива рака предстательной железы после его лечения. *Вестник урологии*. 2013;3:12–19. DOI: 10.21886/2308-6424-2013-0-3-12-19.
11. Сивков АВ, Гурбанов ШШ, Кешишев НГ, Ефремов ГД, Рошин ДА. Внепростатические источники простатического специфического антигена. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2013;3:35–39.
12. Kulakovich O, Strelak N, Artemyev M, Stupak A, Maskevich S, Gaponenko S. Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence. *Nanotechnology*. 2006;17(20):5201–5206. DOI: 10.1088/0957-4484/17/20/026.
13. Кулакович ОС, Стрекаль НД, Артемьев МВ, Ступак АП, Маскевич СА, Гапоненко СВ. Увеличение чувствительности флуоресцентного анализа с использованием островковых пленок серебра на примере альбумина, меченного ФИТЦ. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2006;73(6):797–800.
14. Guzатов DV, Vaschenko SV, Stankevich VV, Lunevich AY, Glukhov YF, Gaponenko SV. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticles: theory, modeling, and experiment. *The Journal of Physical Chemistry*. 2012;116(19):10723–10733. DOI: 10.1021/jp301598w.
15. Романенко АА, Ващенко СВ, Станкевич ВВ, Луневиц АЯ, Глухов ЮФ, Гапоненко СВ. Плазмонное усиление люминесценции конъюгатов изотиоцианата флуоресцеина и иммуноглобулина человека. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2014;81(2):228–232.
16. Strelak N, Maskevich A, Maskevich S, Jardillier JC, Nabiev I. Selective enhancement of Raman or fluorescence spectra of biomolecules using specifically annealed thick gold films. *Biopolymers*. 2000;57(6):325–328. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)57:6<325::AID-BIP10>3.0.CO;2-7.
17. McGeachy A, Dalchand N, Caudill ER, Li N, Dogangun M, Olenick L, et al. Interfacial electrostatics of poly(vinylamine hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly-L-lysine, and poly-L-arginine interacting with lipid bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2018;20(16):10846–10856. DOI: 10.1039/c7cp07353d.
18. Xu X, Angioletti-Uberti S, Lu Y, Dzubiella J, Ballauff M. Interaction of proteins with polyelectrolytes: a comparison between theory and experiment. *Langmuir*. 2019;35(16):5373–5391. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01802.
19. Wang X, Zheng K, Si Y, Guo X, Xu Yi. Protein – polyelectrolyte interaction: thermodynamic analysis based on the titration method. *Polymers*. 2019;11(1):82–100. DOI: 10.3390/polym11010082.
20. Есакова АС, Лаптинская ТВ, Литманович ЕА. Диффузия полидиаллилдиметиламмоний хлорида в водных растворах с добавленной солью. *Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия*. 2010;2:50–56.
21. Semenyuk P, Muronetz P. Protein interaction with charged macromolecules: from model polymers to unfolded proteins and post-translational modifications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1252. DOI: 10.3390/ijms20051252.
22. Gao Sh, Holkar A, Srivastava S. Protein – polyelectrolyte complexes and micellar assemblies. *Polymers*. 2019;11(7):1097. DOI: 10.3390/polym11071097.

### References

1. Akhvladiani ND, Allenov SN, Matyukhov IP. Prostate-specific antigen as a marker for prostate diseases and a target for drug therapy (literature review). *Consilium Medicum*. 2017;19(7):35–40. Russian. DOI: 10.26442/2075-1753\_19.7.35-40.
2. Descotes J-L. Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*. 2019;6(2):129–136. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.11.007.



3. Filella X, Foj L. Novel biomarkers for prostate cancer detection and prognosis. In: Schatten H, editor. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*. Cham: Springer; 2018. p. 15–39. (Advances in experimental medicine and biology; volume 1095). DOI: 10.1007/978-3-319-95693-0\_2.
4. Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1784. DOI: 10.3390/ijms17111784.
5. Solovov VA. Biology of prostate-specific antigen. *Vestnik Samarskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvenno-nauchnaya seriya*. 2005;39(5):200–208. Russian.
6. Sidorenkov AV, Govorov AV, Sadchenko AV, Pushkar DYU. Diagnostic value of [-2]proPSA and PHI index (review of literature). *Onkourologiya*. 2014;10(4):87–95. Russian. DOI: 10.17650/1726-9776-2014-10-4-87-95.
7. Wu D, Ni J, Beretov J, Cozzi P, Willcox M, Wasinger V, et al. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017;118:15–26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002.
8. Salman JW, Schoots IG, Carlsson SV, Jenster G, Roobol MJ. Prostate specific antigen as a tumor marker in prostate cancer: biochemical and clinical aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015;867:93–114. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0\_7.
9. Ponkratov SV, Kheyfets VKh, Kagan OF. Diagnostic value of prostate-specific antigen according to age patients. *Urologicheskie vedomosti*. 2016;6(3):30–39. Russian. DOI: 10.17816/uroved6330-39.
10. Chibichyan MB, Chernogubova EA, Kogan MI. New biochemical markers of recurrence of prostate cancer after his treatment. *Vestnik urologii*. 2013;3:12–19. Russian. DOI: 10.21886/2308-6424-2013-0-3-12-19.
11. Sivkov AV, Gurbanov ShSh, Keshishev NG, Efremov GD, Roshin DA. Extraprostatic sources of the prostate specific antigen. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2013;3:35–39. Russian.
12. Kulakovich O, Strekal N, Artemyev M, Stupak A, Maskevich S, Gaponenko S. Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence. *Nanotechnology*. 2006;17(20):5201–5206. DOI: 10.1088/0957-4484/17/20/026.
13. Kulakovich OS, Strekal' ND, Artem'ev MV, Stupak AP, Maskevich SA, Gaponenko SV. [Improved fluorescent assay sensitivity using silver island films: fluorescein isothiocyanate-labeled albumin as an example]. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2006;73(6):797–800. Russian.
14. Guzatov DV, Vaschenko SV, Stankevich VV, Lunevich AY, Glukhov YF, Gaponenko SV. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticles: theory, modeling, and experiment. *The Journal of Physical Chemistry*. 2012;116(19):10723–10733. DOI: 10.1021/jp301598w.
15. Ramanenka AA, Vaschenko SV, Stankevich VV, Lunevich AY, Glukhov YF, Gaponenko SV. Plasmonic enhancement of luminescence of conjugates of fluorescein isothiocyanate and human immunoglobulin. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2014;81(2):228–232. Russian.
16. Strekal N, Maskevich A, Maskevich S, Jardillier JC, Nabiev I. Selective enhancement of Raman or fluorescence spectra of biomolecules using specifically annealed thick gold films. *Biopolymers*. 2000;57(6):325–328. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)57:6<325::AID-BIP10>3.0.CO;2-7.
17. McGeachy A, Dalchand N, Caudill ER, Li N, Dogangun M, Olenick L, et al. Interfacial electrostatics of poly(vinylamine hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly-L-lysine, and poly-L-arginine interacting with lipid bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2018;20(16):10846–10856. DOI: 10.1039/c7cp07353d.
18. Xu X, Angioletti-Uberti S, Lu Y, Dzubiella J, Ballauff M. Interaction of proteins with polyelectrolytes: a comparison between theory and experiment. *Langmuir*. 2019;35(16):5373–5391. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01802.
19. Wang X, Zheng K, Si Y, Guo X, Xu Yi. Protein – polyelectrolyte interaction: thermodynamic analysis based on the titration method. *Polymers*. 2019;11(1):82–100. DOI: 10.3390/polym11010082.
20. Yesakova AS, Laptinskaya TV, Litmanovich EA. DLS study of diffusion of poly(diallyldimethylammonium chloride) in water solutions with added salt. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 3. Fizika. Astronomiya*. 2010;2:50–56. Russian.
21. Semenyuk P, Muronetz P. Protein interaction with charged macromolecules: from model polymers to unfolded proteins and post-translational modifications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1252. DOI: 10.3390/ijms20051252.
22. Gao Sh, Holkar A, Srivastava S. Protein – polyelectrolyte complexes and micellar assemblies. *Polymers*. 2019;11(7):1097. DOI: 10.3390/polym11071097.