



УДК 541.182.024

*В.А. ЛАЗАРЧИК, О.Н. ВРУБЛЕВСКАЯ, Т.Н. ВОРОБЬЕВА*

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Synthesis of silver sols with particles  $8\pm 15$  nm in size has been developed using stabilization with rabbit antibodies against immunoglobulin. The absorption spectra and electrokinetic potential of sols at different stages of their interaction with biopolymers were studied and the method of silver bioconjugation usage in the solid phase analysis of Salmonella antibodies and Salmonella antigens were proposed.

Конъюгаты наночастиц золота с биомолекулами применяются в качестве маркеров в электронной микроскопии, твердофазном иммуноанализе и меток, усиливающих сигнал биоаффинных взаимодействий в устройствах, называемых биочипами и биосенсорами [1, 2]. Широкие перспективы открываются для использования наночастиц благородных металлов в иммунологии. Исследования в этом направлении стали развиваться благодаря публикации Фулка и Тейлора, в которой впервые конъюгаты коллоидного золота с иммуноглобулинами были использованы в качестве иммунохимического маркера [3]. В последнее время появились работы, в которых в качестве иммунохимических маркеров использовали биоконъюгированные золи серебра [4]. Замена золота коллоидным серебром представляет интерес не только с научной, но и с практической точки зрения, поскольку тест-системы на основе коллоидного серебра более экономичны в сравнении с коллоидным золотом, просты в изготовлении и могут быть альтернативой классическим тест-системам, применяемым в медицине. В исследованиях, посвященных синтезу и изучению свойств коллоидного серебра, отсутствуют систематические данные о способности наноразмерных частиц серебра адсорбировать биополимеры, об агрегативной устойчивости биоконъюгатов и их физико-химических свойствах.

Цель данной работы состояла в выявлении возможностей использования коллоидного серебра в качественном определении антител сальмонеллезной сыворотки - иммуноглобулинов IgG, а также сальмонеллезных антигенов. Для достижения поставленной цели было необходимо решить ряд задач: разработать методику получения устойчивого монодисперсного золя серебра, выявить оптимальные условия конъюгирования коллоидного серебра кроличьими антителами (КА) против иммуноглобулинов, изучить оптические и электрокинетические свойства полученных биоконъюгатов, оценить возможность их использования в выявлении сальмонеллезных антител или сальмонеллезных антигенов.

### **Материал и методика**

Золи серебра получали восстановлением нитрата серебра борогидридом натрия в присутствии цитрат-ионов, выполняющих функцию стабилизатора. Для получения стабильных монодисперсных зольей серебра нами была моди-

фицирована методика, приведенная в [5]. Условия проведения синтеза: температура  $20 \pm 2$  °С, концентрация  $\text{AgNO}_3$   $6 \cdot 10^{-4}$  моль/л, соотношение серебро:цитрат 1:2, pH 7.

Для конъюгирования золя серебра использовали антитела диагностические против иммуноглобулинов кролика, сухие (ИЭМ им. Гамалеи). Конъюгированные золи серебра готовили смешиванием на магнитной мешалке золя серебра с раствором КА. pH конечного раствора не превышал 8, так как оптимальные условия стабилизации биоконъюгированных систем достигаются только при pH приблизительно на 0,5 выше изоэлектрической точки белка. Количество биополимера, необходимое для синтеза стабильного конъюгированного золя серебра, определяли по методике, приведенной в [6]. Изменения спектров поглощения золей выявляли по разности их площадей в интервале длин волн  $\lambda = 500\text{--}600$  нм до и после добавления раствора NaCl (конечная концентрация NaCl в растворе 1 %). Выбор указанной области спектра был обусловлен тем, что при агрегировании частиц в золе наиболее существенные изменения в спектрах поглощения наблюдаются в длинноволновой области. Стабильным являлся золь, при введении в который раствора хлорида натрия площадь оставалась неизменной.

Объектами иммунологических исследований являлись: антитела сальмонеллезной сыворотки (для исследования использовали сыворотку диагностическую сальмонеллезную адсорбированную сухой поливалентную для реакции агглютинации (С.-Петербург, НИИ вакцин и сывороток)); сальмонеллезные антигены, выделенные в НИИ эпидемиологии и микробиологии, инактивированные кипячением.

Оптические свойства золей золота изучали с помощью спектрофотометра Specord M 40. Определяли следующие параметры: длину волны в максимуме поглощения, оптическую плотность, ширину полувысоты по данным спектрофотометрических измерений; форму и распределение частиц по размерам методом просвечивающей электронной микроскопии с помощью электронного микроскопа LEO-640; электрокинетический потенциал методом макроэлектрофореза с использованием прибора Кена. Измерения проводили после диализа золей в бидистиллированной воде. Об электрофоретической подвижности судили по скорости перемещения границы раздела фаз золь - контактная жидкость, в качестве которой использовали  $10^{-3}$  М раствор KCl.  $\xi$ -потенциал рассчитывали по уравнению Гельмгольца - Смолуховского.

### Результаты и их обсуждение

Разработанная методика получения золей серебра из цитратного раствора позволяет синтезировать устойчивые коллоидные системы с частицами

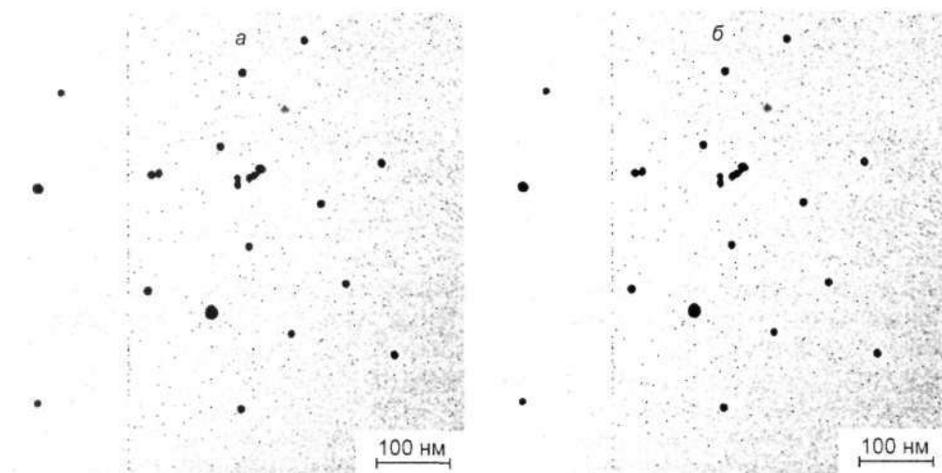


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии: а – наночастицы серебра, б – наночастицы серебра, конъюгированные кроличьими антителами против иммуноглобулинов

сферической и близкой к ней формы размером  $8 \pm 15$  нм (рис. 1 а). Золь характеризуется интенсивным оптическим поглощением в области 490 нм, соответствующей плазмонному пику серебра (рис. 2), что свидетельствует о металлической природе частиц [7]. Методом электрофореза установлено: частицы заряжены отрицательно и величина электрокинетического потенциала составляет  $-46 \pm 3$  мВ. Этот факт можно объяснить тем, что потенциалоопределяющий слой наночастицы представлен отрицательно заряженными тетрагидроборат- и цитрат-ионами, а ионы натрия образуют плотную и диффузную составляющую мицеллы. О достаточно высокой стабильности золя серебра можно судить по отсутствию изменений в спектре поглощения золя в течение двух недель после его приготовления. Необходимо отметить, что золь неустойчив по отношению к электролитам, в частности, добавление NaCl в нестабилизированный золь приводит к быстрой агрегации частиц. При этом изменяется цвет золя, а спектр поглощения приобретает форму бесструктурной полосы.

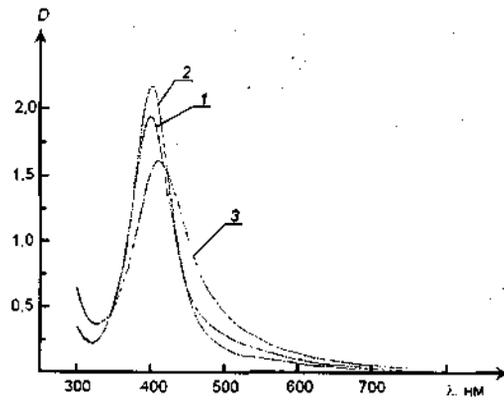


Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – исходного золя серебра; 2 – золь, стабилизированного кроличьими антителами против иммуноглобулинов; 3 – стабилизированного золя после взаимодействия с сальмонеллезными антителами (IgG)

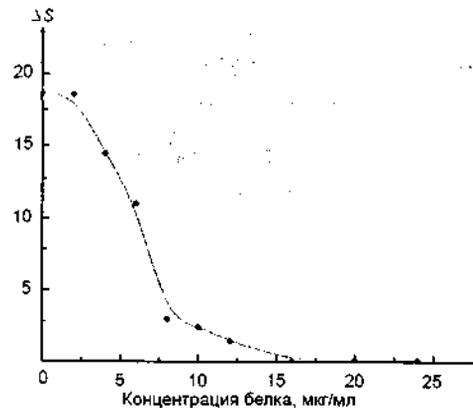


Рис. 3. Изменение площади спектров поглощения золя серебра в диапазоне длин волн 500÷600 нм в зависимости от концентрации кроличьих антител против иммуноглобулинов после добавления соли NaCl до конечной концентрации 1 %

Конъюгирование золя серебра с использованием КА существенно увеличивает устойчивость золя к действию NaCl. На рис. 3 представлены данные, характеризующие зависимость величины площади  $\Delta S$  в диапазоне длин волн 500÷600 нм от концентрации КА после добавления соли NaCl. Как следует из приведенных на рисунке данных, при концентрации КА 16 мкг на 1 мл золя  $\Delta S$  практически не изменяется. По-видимому, при такой концентрации КА золь полностью стабилизируется биополимером. Следует отметить, что добавление КА в указанном количестве приводит к увеличению оптической плотности на  $8 \pm 10$  % и смещению максимума поглощения в длинноволновую область на  $7 \pm 8$  нм в сравнении со спектром исходного золя (см. рис. 2). Ширина полувысоты практически постоянна и находится в пределах  $70 \pm 73$  нм.

Стабилизация золью КА приводит к изменению  $\xi$ -потенциала: он сдвигается в менее отрицательную область на 14 мВ в сравнении с нестабилизированным золью и составляет  $-31 \pm 4$  мВ. По результатам электронно-микроскопического исследования размер частиц в золе серебра за счет адсорбции КА увеличивается на  $2 \pm 3$  нм (рис. 1 б).

Очевидно, что оптические и электрокинетические свойства обусловлены формированием полимолекулярной оболочки при адсорбции КА на по-

верхности частиц серебра. Адсорбция происходит за счет электростатического взаимодействия функциональных групп белка и донорно-акцепторного взаимодействия сульфгидрильных групп в остатках серосодержащих аминокислот с серебром на поверхности наночастиц [2]. Кроме того, адсорбция белка изменяет диэлектрическую проницаемость среды вблизи поверхности наночастиц, поэтому в спектрах поглощения наночастиц с биополимерной оболочкой наблюдаются существенные изменения в сравнении со спектрами исходных зольей.

Использование биоконъюгированных зольей металлов в иммуноанализе основано на том, что биомолекулы, адсорбированные на поверхности наночастиц, не теряют способности вступать в биоспецифические реакции. Так, при взаимодействии белковых молекул, конъюгированных на наночастицах, со своими биоспецифическими парами (антиген - антитело, авидин - биотин, фермент - субстрат и т. д.) формируется вторичная биополимерная оболочка, образование которой приводит как к визуально очевидному изменению цвета золя, так и его физико-химических свойств [2].

Для оценки возможности использования коллоидного серебра в иммуноанализе изучали изменения оптических свойств золя в результате вторичной адсорбции IgG на наночастицах серебра, конъюгированных КА. В раствор биоконъюгата серебра вносили IgG до концентрации 90 мкг/мл. Систему инкубировали около 30 мин при 40 °С. Затем изучали спектры поглощения в диапазоне длин волн 300÷800 нм.

Внесение IgG в биоконъюгированный золь серебра вызывает потемнение раствора, что свидетельствует об агрегации частиц. Согласно спектрофотометрическим исследованиям введение в золь IgG приводит к тому, что оптическая плотность в максимуме поглощения уменьшается на 18±20 %, максимум поглощения смещается в длинноволновую область на 10±13 нм, область поглощения уширяется - ширина полувысоты увеличивается на 22±27 нм (см. рис. 2). Таким образом, взаимодействие IgG с КА, адсорбированными на поверхности наночастиц серебра, детектируется не только визуально, но и спектрофотометрически. Факт изменения спектра поглощения биоконъюгированного золя серебра в присутствии IgG может быть положен в основу создания метода их количественного определения.

Одной из задач данной работы являлось выяснение возможности использования наночастиц серебра, конъюгированных КА, в качественном определении IgG методом твердофазного анализа (дот-блот-анализ) на различных биополимерных подложках - нитроцеллюлозе, полистиролполистироле, ацетатцеллюлозе. Для проведения эксперимента сыворотку, содержащую IgG, наносили на биополимерную мембрану, после чего мембрану промывали в дистиллированной воде и инкубировали в растворе приготовленного биоконъюгата серебра. Взаимодействие IgG с КА, адсорбированными на поверхности серебряных наночастиц, на мембране проявлялось в виде желтых пятен.

Для выяснения возможностей использования коллоидного серебра в выявлении сальмонеллезных антигенов был проведен следующий эксперимент: суспензию инактивированных кипячением клеток сальмонелл (концентрацию клеток варьировали в пределах  $1.10_{2-3} \cdot 10^9$  клеток/мл) фиксировали на биополимерной мембране в течение 15±20 мин при комнатной температуре. После сорбции мембрану дважды отмывали фосфатным буфером pH 7,2, содержащим 150 mM NaCl, и погружали на 30 мин в 1 % раствор бычьего сывороточного альбумина для блокирования сайтов неспецифической адсорбции [8, 9]. После этого полоску инкубировали в растворе IgG (30 мкг/мл) в течение 1 ч при температуре 30 °С, что обеспечивало связывание антител сальмонеллезной сыворотки с сальмонеллезными антигенами за счет пространственной комплементарности антител и антигенов в результате электростатического взаимодействия функциональных групп и образования водородных связей. При обработке полученного иммунного комплекса антиген - антитело зольем серебра, конъюгированным КА, на

мембране проявлялось свидетельствующее о протекании биоспецифических реакций желтое пятно, окраска которого интенсифицировалась в течение 1 ч. Как показал эксперимент, чувствительность определения сальмонеллезных антигенов не зависит от природы испытанных в работе полимерных подложек и составляет  $10^3$  клеток/мл.

Таким образом, на основе предложенного метода синтеза стабильных золей серебра с частицами размером  $8 \pm 15$  нм, конъюгированных КА, показано, что для стабилизации золя требуется не менее 6 мкг антител на 1 мл золя при концентрации серебра в растворе  $6 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Установлено, что конъюгирование золя серебра КА приводит к изменениям в спектре поглощения золя: оптическая плотность увеличивается на  $8 \pm 10$  %, максимум поглощения смещается в длинноволновую область на  $7 \pm 8$  нм в сравнении со спектром исходного золя, при этом ширина полувысоты практически не изменяется, увеличивается  $\xi$ -потенциал системы. Впервые показано, что взаимодействие IgG с КА, адсорбированными на наночастицах серебра, может быть выявлено методом спектрофотометрии, поскольку формирование вторичной биополимерной оболочки на наночастицах серебра существенно уменьшает оптическую плотность в максимуме поглощения и изменяет его вид и положение в сравнении с биоconъюгированным золем серебра. Показана возможность использования биоconъюгатов серебра в твердофазном анализе для выявления IgG и сальмонеллезных антигенов.

1. Ершов Б. Г. // Рос. хим. журн. 2001. Т. 45. № 3. С. 20.
2. Nanoparticles / Ed. by G. Schmid. 2004. P. 434.
3. Faulk W., Taylor G. // Immunochemistry. 1971. Vol. 8. P. 411.
4. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю. и др. // Клин. диагностика. 2002. № 6. С. 38.
5. Brada D., Roth J. // Analytical Biochemistry. 1984. Vol. 142. P. 79.
6. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А. и др. // Коллоид. журн. 1995. Т. 57. №3. С. 412.
7. Boren C. F., Hufman D. R. Adsorption and Scattering of Light by small Particles. New York, 1983. P. 342.
8. Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Матора Л.Ю. и др. // Микробиология. 1991. Т. 60. Вып. 3. С. 524.
9. Загоскина Т. Ю., Калиновский А.И., Марков Е. Ю. // Клин. диагностика. 1999. № 3. С. 39.

Поступила в редакцию 20.12.05.

**Владимир Александрович Лазарчик** - аспирант кафедры неорганической химии. Научный руководитель - Т.Н. Воробьева.

**Ольга Николаевна Врублевская** - кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии тонких пленок НИИФХП БГУ.

**Татьяна Николаевна Воробьева** - доктор химических наук, профессор кафедры неорганической химии.