

УДК 543.9, 546.06, 577.112

ОРИЕНТИРОВАННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ И ИХ ФРАГМЕНТОВ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ КРЕМНИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НАНОСЕНСОРОВ

Г.В. Преснова, Д.Е. Преснов*, В.Г. Григоренко, А.М. Егоров, М.Ю. Рубцова

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; e-mail: gpresnova@gmail.com)

Исследованы методы ковалентной иммобилизации специфических антител и их фрагментов на кремнии с последующим формированием иммунных комплексов, состоящих из молекулы иммобилизованного моноклонального антитела, молекулы антигена и молекулы второго моноклонального антитела, меченного наночастицей золота. В качестве антигена исследован простат-специфический антиген (ПСА), являющийся молекулярным биомаркером рака предстательной железы. Получен ковалентный конъюгат фрагментов специфических к ПСА антител с наночастицами золота с использованием собственных тиоловых групп антител. Для регистрации иммунных комплексов на поверхности носителя использована сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Высокая разрешающая способность метода позволила регистрировать единичные иммунные комплексы по наличию в них наночастиц золота и рассчитать их количество. Разработана методика химической модификации кремния 3-аминопропилтриметоксисиланом (АПТМС) и бифункциональным реагентом 1,4-фенилендиизотиоцианатом (ФДИТЦ), обеспечивающая равномерность распределения и доступность антигенсвязывающих центров для образования иммунных комплексов. Разработанный метод иммобилизации перспективен для формирования специфического распознающего слоя биосенсоров на основе кремниевых нанопроводов.

Ключевые слова: специфические антитела, взаимодействие антиген-антитело, наночастицы золота, простат-специфический антиген, сканирующая электронная микроскопия.

В настоящее время наблюдается быстрое развитие нанобиотехнологий, в том числе аналитических, для применения в персонализированной медицине. Создание новых методов анализа требует решения задач миниатюризации и возможности определения белков и других биологически активных соединений в многокомпонентном биологическом материале (в широком диапазоне концентраций), включающем область ультранизких концентраций (ниже 10^{-11} М). Перспективными являются методы, представляющие комбинацию нанотехнологических и биотехнологических подходов. В связи с этим большое внимание уделяется изучению наноразмерных устройств, примером которых являются сенсорные элементы на основе нанопроводов. Благодаря современным успехам в области нанолитографии, связанным, в первую очередь, с интенсивным развитием полупроводниковой микро- и нанoeлектроники, широкое распространение

получили нанопровода из полупроводниковых материалов, таких как кремний, германий, и оксидов металлов (оксид цинка, оксид олова (IV), оксид индия (III) и т.д.) [1]. В настоящее время одной из перспективных для создания наноустройств является полупроводниковая кремниевая технология [2, 3]. Преимуществом кремния как носителя является возможность разнообразной химической модификации в целях получения на его поверхности реакционноспособных групп для ковалентной иммобилизации биологических молекул.

Использование нанопроводов для конструирования биосенсоров позволяет создать миниатюрные устройства, обладающие высокой чувствительностью, быстрым формированием отклика и, как правило, не требующие меченых реагентов для проведения анализа. Для изготовления таких структур используются современные методы нанолитографии, что обуславливает их невы-

*НИИ Ядерной Физики им. Д.В. Скобельцына, МГУ имени М.В. Ломоносова; Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова.

сокую стоимость и возможность интеграции на одно электронное устройство нескольких сенсоров для определения различных аналитов, т.е. создания так называемой «лаборатории на чипе» [4, 5]. Установлено, что использование молекулярных детекторов на основе регистрации единичных взаимодействий антиген-антитело методом атомно-силовой микроскопии на чипах из кремния и слюды способствует как получению данных для характеристики свойств сенсорного слоя (плотности и равномерности заполнения поверхности), так и достижению ультравысокой чувствительности определения при обеспечении условия необратимости образования иммунных комплексов [6, 7]. Перспективным является использование сочетания уникальных свойств наноструктурированных материалов и различных наночастиц [8, 9].

Кремниевые нанопровода являются перспективным материалом для создания наноразмерных сенсорных устройств, так как они потенциально совместимы со стандартной технологией полупроводникового производства и позволяют проводить определение в режиме реального времени. Для обеспечения их высокой чувствительности необходимо разработать методы ориентированной иммобилизации распознающих элементов (специфических антител и их фрагментов).

Цель данной работы – изучение методов химической модификации кремния, обеспечивающих ковалентное связывание антител с высокой плотностью заполнения поверхности и необходимую ориентацию активных центров. В качестве определяемого соединения исследован простат-специфический антиген (ПСА), являющийся молекулярным биомаркером рака предстательной железы.

Для детекции единичных взаимодействий антиген-антитело использовали конъюгат фрагментов специфических к ПСА антител с наночастицами золота, регистрацию которых проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Экспериментальная часть

В настоящей работе использовали реагенты компаний «Sigma» и «Fluka». ПСА и два клона моноклональных антител к ПСА были предоставлены ЗАО «НВО Иммунотех» (Россия). Наночастицы золота со средним диаметром 25 нм получали по методу Френса, основанному на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия [9]. Размеры полученных наночастиц золота охарактеризованы

спектрофотометрически и подтверждены методом СЭМ.

Для иммобилизации антител на поверхности кремния получали $F_{(ab)_2}$ -фрагменты антител первого клона методом гидролиза протеолитическим ферментом пепсином в течение двух дней при 37°C с последующей очисткой фрагментов методом ВЭЖХ. Эффективность гидролиза контролировали методом белкового электрофореза в полиакриламидном геле.

Для получения конъюгата моноклональных антител с наночастицами золота методом ковалентного связывания использовали фрагменты антител второго клона, представляющие собой цепи (одну тяжелую и одну легкую) иммуноглобулинов и имеющие собственные доступные тиоловые группы. Разделение молекул антител на два симметричных фрагмента с использованием 2-меркаптоэтиламина (МЭА) и получение конъюгата антител с наночастицами золота проводили, как описано ранее [10, 11].

Поверхность кремниевых пластин очищали кислородной плазмой в установке реактивного ионного травления «RDE-300» («Alcatel», Франция) в течение 30 мин. Затем поверхность кремния химически модифицировали различными методами.

1. Модификация 3-глицидопропилтриметоксисиланом (ГОПС). Кремниевые пластины обрабатывали 10 мМ раствором ГОПС в сухом толуоле в течение 12 ч при 80°C, затем отмывали и выдерживали при 100°C в течение 10 мин [7].

2. Модификация аминопропилтриметоксисиланом (АПТМС). Кремниевые пластины прогревали в течение 1 ч при 100°C и помещали в емкость, содержащую 10%-й раствор АПТМС в этаноле, отфильтрованный через фильтр (0,2 мкм). После инкубации в течение ночи образцы промывали три раза этанолом, затем дистиллированной водой. Далее высушенные образцы выдерживали в сушильном шкафу при 100°C в течение 10 мин.

3. Модификация с применением 3-аминопропилсилатрана (АПС). Кремниевые пластины, прогретые в течение 1 ч при 100°C, помещали в емкость, содержащую 167 мкМ раствор АПС в воде, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем образцы промывали три раза дистиллированной водой и высушивали воздухом.

4. Модификация с использованием реагента 1,4-фенилендиизотиоцианат (ФДИТЦ). Кремниевые пластины, модифицированные АПС или

АПТМС, погружали в раствор 6 мг ФДИТЦ в ДМФА, содержащий 10%-й пиридин, и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученные образцы отмывали при перемешивании три раза в метиловом спирте и затем в деионизованной воде.

Для иммобилизации моноклональных антител, специфичных к ПСА, на модифицированную поверхность пластин наносили по 1 мкл растворов антител (или их фрагментов) с концентрацией 100 мкг/мл в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,15 М NaCl (ФСБ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После этого пластины отмывали три раза по 5 мин в буферном растворе ФСБТ, содержащем 0,1% Tween 20. После иммобилизации проводили блокирование свободных центров связывания белков на поверхности пластин для уменьшения неспецифических реакций с помощью 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина в ФСБ (1 ч, 37°C). Далее проводили реакцию связывания с ПСА в ФСБТ в течение 1 ч при 37°C. После отмывки образовавшиеся иммунные комплексы на поверхности кремния выявляли конъюгатом фрагментов второго клона антител к ПСА, меченных золотыми наночастицами. В качестве контрольной использовали поверхность пластины, на которую специфические антитела не наносились.

Определение числа наночастиц на поверхности кремния проводили в растровом сканирующем электронном микроскопе «Supra-40» («Carl Zeiss», Германия) со встроенным в колонну микроскопа детектором вторичных электронов «InLens». Образец помещали практически вплотную к объективной линзе микроскопа для уменьшения рабочего расстояния. В зависимости от геометрических размеров образцов оптимальные рабочие расстояния составляли величину от 0,4 до 1,8 мм. Ускоряющее напряжение и силу тока луча подбирали таким образом, чтобы золотые частицы были видны с наилучшим разрешением и контрастом. Для подсчета выявленных частиц использовали программное обеспечение Gwyddion («Czech Metrology Institute», Чехия). Число иммунных комплексов, образующихся на единице площади носителя (1 мкм²), рассчитывали по числу зарегистрированных наночастиц.

Результаты и обсуждение

Выявление иммунных комплексов на поверхности кремния сканирующей электронной микроскопией. В работе исследовали об-

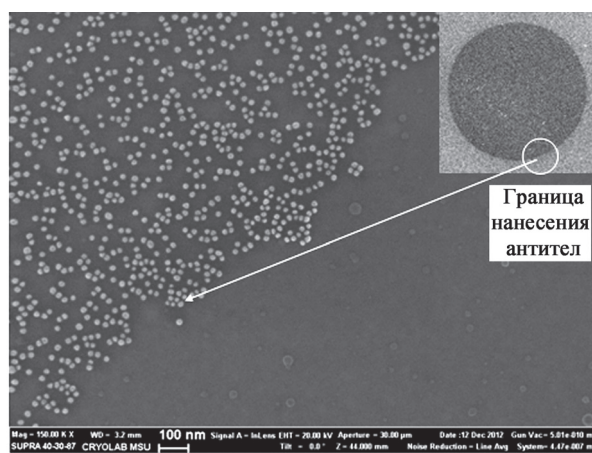


Рис. 1. СЭМ-изображение фрагмента поверхности кремния, включающего границу нанесения специфических антител, после выявления иммунных комплексов ПСА конъюгатом антител, меченных наночастицами золота

разование сэндвич-комплексов, состоящих из антигена и двух молекул антител, направленных к неперекрывающимся антигенным детерминантам. Антитела первого типа ковалентно иммобилизовали на поверхности носителя. Для выявления иммунных комплексов на поверхности получали конъюгат второго клона моноклональных антител с наночастицами золота размером 25 нм методом ковалентного связывания. Для выявления наночастиц золота на поверхности кремния была использована СЭМ.

На рис. 1 изображен включающий границу нанесения специфических антител фрагмент поверхности кремния с иммобилизованными иммунными комплексами после выявления конъюгатом вторых антител с наночастицами золота. Наночастицы золота хорошо видны в анализируемой зоне, их распределение равномерно. Оптимизация условий инкубации и отмывок позволила добиться низкого уровня неспецифического связывания конъюгата антител с наночастицами и поверхности кремния. Граница нанесения зоны первых антител хорошо видна. Визуально хорошо заметно различие в распределении наночастиц золота в тестовой и контрольной зонах. В зоне, где специфические антитела не были нанесены, наночастицы золота практически отсутствуют. Таким образом, каждая зарегистрированная на поверхности наночастица входит в состав одного иммунного комплекса, что позволяет регистрировать результат единичных взаимодействий антиген-антитело по наличию наночастиц.

Число и размер наночастиц золота, наблюдаемых в кадре, зависит от значения увеличения электронного микроскопа и, соответственно,

размера кадра. При большом размере кадра получались более точные значения числа частиц, однако с увеличением размера кадра уменьшалось разрешение отдельных частиц. Для оптимизации метода выявления наночастиц исследовали три увеличения (150000×, 75000× и 35000×), площадь кадра составляла соответственно 1,7; 6,8 и 32,2 мкм². Было показано, что оптимальным увеличением для подсчета частиц и определения плотности заполнения поверхности является увеличение 75000×. Установлено, что для получения воспроизводимых данных достаточно усреднить значения, рассчитанные для трех фрагментов одной зоны носителя.

Ранее мы показали, что благодаря высокой разрешающей способности метод СЭМ позволяет регистрировать результаты индивидуальных биоспецифических взаимодействий [11]. Четкое изображение наночастиц, получаемое методом СЭМ, может быть использовано для подсчета наночастиц золота на поверхности. Оно будет равно числу иммунных комплексов, образовавшихся на анализируемой области носителя. Таким образом, метод СЭМ позволяет вести регистрацию результатов комплексообразования антител с антигеном по числу образовавшихся иммунных комплексов. При обработке результатов полагали, что число образовавшихся иммунных комплексов будет равно числу наночастиц золота за вычетом числа наночастиц, связанных неспецифично на контрольной зоне такой же площади.

Сравнение методов ковалентной иммобилизации антител на поверхности кремния. В данной работе исследованы несколько способов химической модификации кремния для осуществления ковалентной иммобилизации специфических антител и их фрагментов: а) модификация ГОПС; б) модификация АПТМС; в) модификация АПС; д) обработка кремния, предварительно модифицированного АПТМС или АПС, бифункциональным реагентом ФДИТЦ; е) модификация ФДИТЦ.

Схематическое изображение методов модификации приведено на рис. 2.

Одновалентные фрагменты специфических антител к ПСА, представляющие собой половину молекулы из одной тяжелой и одной легкой цепи и имеющие доступные тиоловые группы, получали с использованием 2-меркаптоэтиламина. Эффективность методов иммобилизации оценивали по нескольким параметрам: анализировали изображение СЭМ, отмечали наличие неравномерности в распределении наночастиц на поверхности, локальную агломерацию наночастиц и наличие неспецифического связывания. Для сравнения между собой разных методов иммобилизации рассчитывали среднее значение числа наночастиц, приходящихся на 1 мкм² поверхности. При обработке результатов полагали, что число образовавшихся иммунных комплексов будет равно числу наночастиц золота за вычетом числа наночастиц, связанных на контрольной зоне такой же площади с иммобилизованными антителами, неспецифичными к ПСА. Сравнительный анализ проводили при использовании ПСА в концентрации 10 нг/мл. Полученные результаты приведены в таблице.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что модификация поверхности кремния с использованием АПТМС и бифункционального реагента ФДИТЦ позволяет зарегистрировать максимальное количество иммунных комплексов на поверхности. В этом случае иммуноглобулины связываются через свою доступную амино-группу. При этом другой способ, в котором также используются доступные амино-группы антител (модификация кремния ГОПС) оказался наименее эффективным. Совместное использование модифицирующего и бифункционального реагентов позволило удалить активные центры от поверхности, уменьшить влияние стерических факторов и обеспечить более благоприятную ориентацию активных центров. Вероятно, при обработке ГОПС антитела ориен-

Результаты определения плотности распределения наночастиц золота в составе иммунных комплексов на поверхности кремния, модифицированного различными реагентами (для получения иммунных комплексов использовали ПСА в концентрации 10 нг/мл)

Реагент для модификации кремния	ГОПС	АПТМС	АПС	АПТМС+ФДИТЦ	АПС+ФДИТЦ
Число выявленных наночастиц золота в составе иммунных комплексов (на 1 мкм ² поверхности)	15±1	34±2	70±5	173±16	95±6

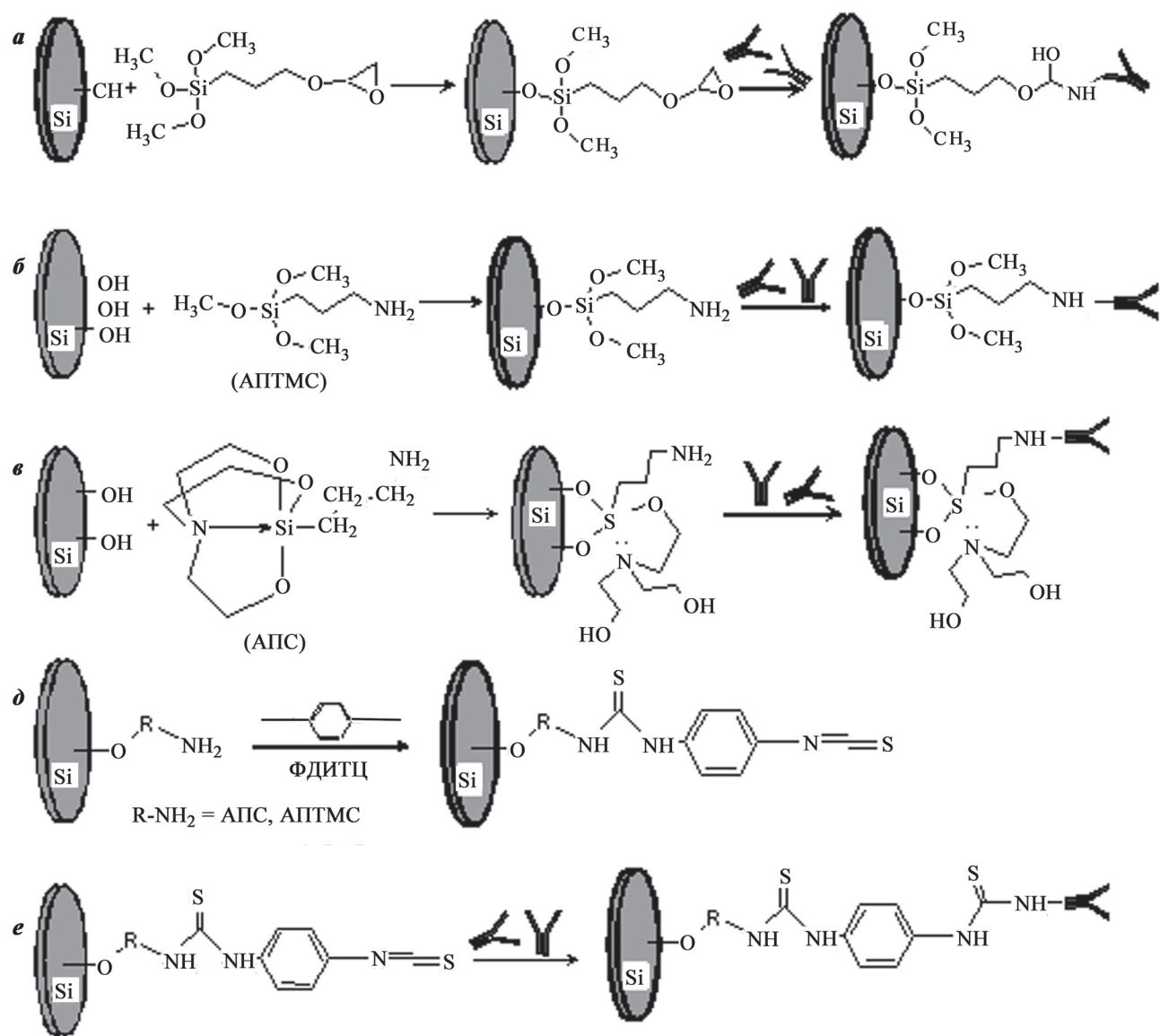


Рис. 2. Схематическое изображение методов модификации кремния, исследованных в работе

тируются своими антигенсвязывающими центрами в сторону носителя. Оба метода характеризуются более равномерным распределением иммунных комплексов на поверхности кремния по сравнению с другими способами, в которых антитела связываются с поверхностью через карбоксильные группы (модификация с использованием АПТМС и АПС).

Для увеличения плотности иммобилизованных активных центров антител представляется перспективным использование не целых молекул антител, а их $(\text{Fab})_2$ -фрагментов, которые имеют то же число активных центров, но меньший размер молекулы. Для иммобилизации применяли метод модификации кремния с использованием АПТМС и ФДИТЦ. На рис. 3 приведены СЭМ-изображения поверхности с выявленными иммун-

ными комплексами, полученные при иммобилизации как целых антител (*a*), так и их фрагментов (*b*). Плотность выявленных комплексов составила 235 ± 10 и 293 ± 12 на 1 мкм^2 соответственно. Более плотное распределение иммобилизованных антигенсвязывающих центров наблюдали при использовании фрагментов антител, несмотря на то что концентрация фрагментов в исходном препарате была много ниже концентрации препарата нативных антител (1 мкг/мл и 100 мкг/мл соответственно).

На рис. 4 представлена градуировочная кривая для определения ПСА в сыворотке крови, полученная с использованием метода иммобилизации специфических антител на кремнии, модифицированном АПТМС и ФДИТЦ. Предел обнаружения ПСА составил 0,01 нг/мл, что на

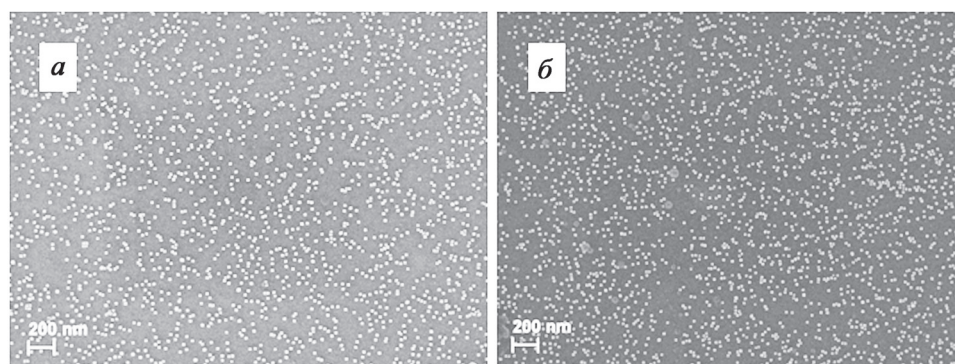


Рис. 3. СЭМ-изображение поверхности кремния с иммунными комплексами, полученными с использованием иммобилизованных нативных антител (а) и их (Fab)₂-фрагментов (б); концентрация ПСА 150 нг/мл

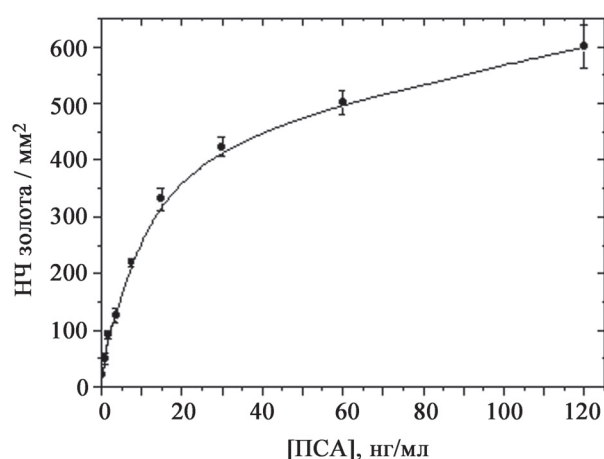


Рис. 4. Градуировочная кривая для определения ПСА в сыворотке крови, полученная с применением метода иммобилизации специфических антител на кремнии, модифицированного с использованием АПТМС и ФДИТЦ. Для выявления на поверхности иммунных комплексов использовали вторые антитела, меченные наночастицами золота, которые регистрировали СЭМ

два порядка ниже предела обнаружения стандартного иммуноферментного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-01137).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Curreli M., Zhang R., Ishikawa F.N., Chang H.K., Cote R.J., Zhou C., Thompson M.E. // IEE Transactions on nanotechnology. 2008. Vol. 7. P. 651.
2. Cui Y., Wei Q., Park H., Lieber C.M. // Science. 2001. Vol. 293. P. 1289.
3. Patolsky F., Zheng G., Lieber C.M. // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1. P. 1711.
4. Fiorini G.S., Chiu D.T. // Bio Techniques. 2005. Vol. 38. P. 429.
5. Ray S., Reddy P.J., Choudhary S., Raghu D., Srivastava S. // J. Proteomics. 2011. Vol. 74. P. 2660.
6. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. // Proteomics. 2007. Vol. 7. P. 4.
7. Иванов Ю.Д., Учайкин В.Ф., Плешакова Т.О., Французов П.А., Светлов С.К., Конев В.А. // Физиология и патология иммунной системы. 2006. Vol. 10. P. 11.
8. Bally M., Vörös J. // Nanomedicine. 2009. Vol. 4. P. 447.
9. Wang, J. // Chem. Phys. Chem. 2009. Vol. 10. P. 1748.
10. Frens, G. // Nat. Phys. Sci. 1973. Vol. 241. P. 20.
11. Karyakin A.A., Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 805.
12. Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Presnov D.E., Grigorenko V.G., Yaminsky I.V., Egorov, A.M. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2014. Vol. 8. P. 164.

ORIENTED IMMOBILIZATION OF ANTIBODIES AND THEIR FRAGMENTS ON THE MODIFIED SILICON TO CREATE NANOSENSORS

G.V. Presnova, D.E. Presnov, V.G. Grigorenko, A.M. Egorov, M.Yu. Rubtsova

(Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University)

Diferent methods for covalent immobilization of specific antibodies and their fragments on silicon surface with the subsequent formation of immune complexes, consisting of immobilized monoclonal antibody, an antigen molecule and a second molecule of the monoclonal antibody labeled with gold nanoparticles, were studied. A new method for the chemical modification of silicon with 3-aminopropyltrimetoxysilane (APTMS) and the bifunctional reagent 1, 4-phenylene diisothiocyanate (PDITC) was developed. It provides uniform distribution and availability of antigen-binding centers for the formation of immune complexes. Gold nanoparticles were used as labels for the immune complexes, and they were introduced through the interaction of biotin with streptavidin. Scanning electron microscopy (SEM) was applied for the registration of immune complexes on the surface. High resolution of the method allowed the registration of the immune complexes by the presence of gold nanoparticles and count their number. The method developed is promising for the formation of biospecific layers on biosensors based on silicon nanowires.

Key words: specific antibodies, antigen-antibody interaction, gold nanoparticles, scanning electron microscopy.

Сведения об авторах: *Преснова Галина Васильевна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (gpresnova@gmail.com); *Преснов Денис Евгеньевич* – ст. науч. сотр. НИИЯФ МГУ, науч. сотр. физического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (denis.presnov@phys.msu.ru); *Григоренко Виталий Георгиевич* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); *Егоров Алексей Михайлович* – гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. биол. наук, профессор (alex.m.egorov@gmail.com); *Рубцова Майя Юрьевна* – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук, доцент (mrubtsova@gmail.com).