

РАЗРАБОТКА ИММУНОСОРБЕНТА ДЛЯ ТВЁРДОФАЗНОГО ЯМР-АНАЛИЗА

П. В. Храмцов^{1,2,*}, М. Д. Кропанева¹, М. С. Бочкова¹,
В. П. Тимганова¹, С. А. Заморина^{1,2}, М. Б. Раев^{1,2}

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым 07.08.2018 г.

Поступило 27.09.2018 г.

Оптимизировали условия конструирования реагента-иммуносорбента для твёрдофазного ЯМР-анализа. Для этого увеличили площадь сенсibiliзировавшего участка мембраны до размеров катушки релаксометра и добавили буфер для сорбции агентов. Это обеспечило проникновение молекул антилиганда в толщу мембраны и их равномерное распределение.

Ключевые слова: ядерный магнитный резонанс, магнитные наночастицы, анализ, конъюгат.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524845637-640>

В последние годы были разработаны многочисленные системы диагностики *in vitro* на основе ЯМР-релаксометрии [1–5], предназначенные для использования при оценке качества пищевых продуктов и диагностике социально значимых инфекционных заболеваний. Принцип подобных сенсоров заключается в определении изменения времени релаксации протонов воды T_2 в присутствии в магнитном поле агрегатов магнитных наночастиц [6]. Формирование агрегатов приводит к снижению T_2 , что даёт возможность создавать гомогенные методы анализа, схожие с традиционными агглютинационными тестами, в которых “слипание” магнитных наночастиц происходит при добавлении их в пробы, содержащих аналит.

Все известные тест-системы, в основе которых лежит принцип релаксометрии T_2 , являются гомогенными. Несмотря на свои преимущества, прежде всего простоту и оперативность, гомогенные методы, как правило, уступают в своей чувствительности и специфичности гетерогенным методам, базирующимся на разделении компонентов анализа при помощи твёрдой фазы. Создание твёрдофазного ЯМР-анализа является одним из направлений работы нашей научной группы. Принципиальные отличия

ЯМР-релаксометрии от традиционных колориметрических методов диктуют необходимость использования новых подходов к разработке твёрдофазного реагента.

Целью работы была оптимизация условий конструирования твёрдофазного реагента (иммуносорбента) для ЯМР-анализа.

В качестве детектирующего агента использовали наночастицы железа, покрытые углеродной оболочкой (Fe@C) [7]. Амнирование Fe@C осуществляли согласно [8]. Функционализацию наночастиц Fe@C G-белком производили по двухэтапной технологии, описанной нами ранее [9], с небольшими изменениями. Первоначально 2,25 мл суспензии, содержащей амнированные наночастицы Fe@C-NH₂ в концентрации 10 мг/мл, смешивали с 625 мкл 20%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в воде, затем объём суспензии доводили до 4,5 мл 0,15 М фосфатным буфером (ФБ), после чего добавляли концентрированный раствор NaOH до pH 7,2–7,5. Суспензию кратковременно обрабатывали ультразвуком и смешивали с равным объёмом глутарового альдегида, pH которого предварительно приводили к значению 7,2–7,5. После получасовой инкубации соникат хроматографировали на колонке с Sepharose CL-6B (объём геля 160 мл, колонка ХК 16/40, элюирующий буфер ФБ, скорость элюции 80 мл/час) для удаления несвязавшихся БСА и глутарового альдегида. Полученные фракции, содержащие углеродные частицы, объединяли и концентрировали до объёма 4,5 мл. Активированную

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской Академии наук, Пермь

² Пермский государственный национальный
исследовательский университет

* E-mail: khramtsovpavel@yandex.ru

глутаральдегидом концентрированную суспензию объёмом 4,5 мл смешивали с G-белком в отношении 80 мкг белка на 1 мг наночастиц и инкубировали в течение ночи при 4°C. Несвязавшийся белок G удаляли гелем-хроматографией на колонке с Sepharose CL-6B в тех же условиях. Вышедшие в холостом объёме фракции объединяли, добавляли БСА и глицерин до конечной концентрации 1 и 20% соответственно.

Твёрдофазный анализ проводили следующим образом. На полоски нитроцеллюлозной мембраны размером 20 × 5 мм и диаметром пор 8 мкм сорбировали IgG (использовали мышинные IgG₂ против простатспецифического антигена человека) в концентрации 10 мкг/мл. Сорбцию IgG осуществляли из буферных растворов с разными значениями pH, в которые вносили глицерин, додецилсульфат натрия (ДСН) и плюроник F127 ("Sigma-Aldrich", США). Далее полоски высушивали 15 мин при комнатной температуре, затем полчаса — при 37°C, после чего их помещали в пластиковые планшеты, в которых проводили все дальнейшие процедуры. Затем полоски трёхкратно промывали ФБ с твином-20 (ФБТ), блокировали 1%-м раствором БСА в ФБТ в течение часа, вновь промывали и вносили в лунки 0,01% суспензии Fe@C-NH₂/БСА/G-белок. Спустя 60 мин полоски отмывали и проводили измерение времени релаксации протонов при помощи портативного ЯМР-релаксометра.

Мы обнаружили (рис. 1), что наибольшая чувствительность определения достигается при сорбции IgG на нитроцеллюлозной мембране в буфере с pH, равным изоэлектрической точке белка

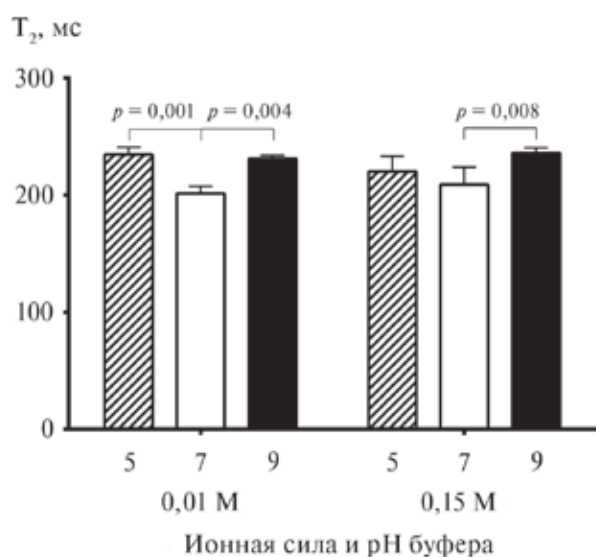


Рис. 1. Влияние ионной силы и pH буфера для нанесения на интенсивность сигнала при ЯМР-анализе. Здесь и на рис. 2 и 3 $M \pm SD$, $n = 3$, критерий Тьюки.

(pH 7), независимо от ионной силы раствора (0,01 и 0,15). Полученные результаты согласуются с данными Low с соавт. [10], которые выявили подобную закономерность для колориметрических тестов, а также с результатами работы [11], где было показано позитивное влияние нейтрального буфера для сорбции на сохранение антигенной структуры антител.

Особенностью метода измерения релаксации протонов является необходимость нахождения магнитных наночастиц в толще мембраны, в порах которой сосредоточено наибольшее число молекул воды. Ранее было показано [12, 13], что сорбция IgG на нитроцеллюлозных мембранах осуществляется главным образом на поверхности, что может приводить к низкой эффективности определения. Известно, что изменение состава буфера для нанесения может существенно влиять на распределение белка в толще мембраны [12]. Мы проверили разные добавки: ДСН в концентрациях от 0,01 до 1%, глицерин от 0,01 до 1%, плюроник F127 от 0,01 до 0,05%. Роль добавок состояла также в обеспечении более равномерного распределения молекул сорбированного белка на мембране [12, 14], поскольку негетогенное распределение белка и связанных с ним наночастиц может приводить к изменениям времени релаксации протонов, которое будет обусловлено не количеством наночастиц в толще мембраны, а значит, приведёт к некорректным

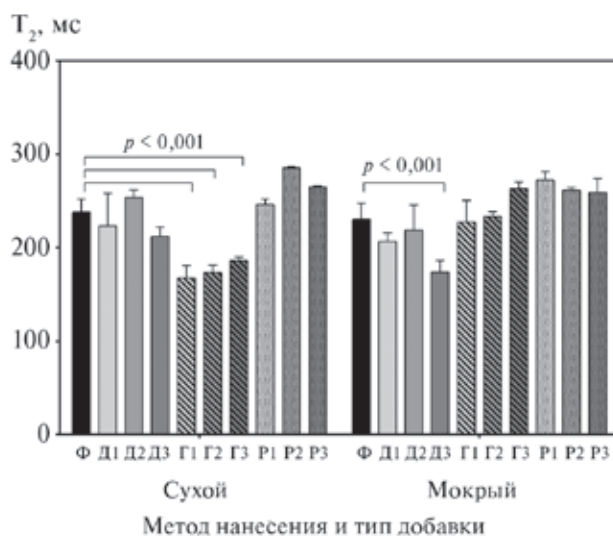


Рис. 2. Влияние метода нанесения IgG на нитроцеллюлозную мембрану и состава буфера для нанесения на время релаксации протонов воды T₂. Ф — ФБ, Д1 — ФБ + 0,01% ДСН, Д2 — ФБ + 0,1% ДСН, Д3 — ФБ + 1% ДСН, Г1 — ФБ + 0,1% глицерин, Г2 — ФБ + 1% глицерин, Г3 — ФБ + 10% глицерин, П1 — ФБ + 0,1% плюроник F127, П2 — ФБ + 0,2% плюроник F127, П3 — ФБ + 0,4% плюроник F127.

результатам анализа. В ряде экспериментов сорбцию IgG осуществляли на предварительно смоченную мембрану, что также позволяет улучшить однородность окрашивания точек в колориметрических твёрдофазных анализах [15]. Мы обнаружили, что добавление 1% ДСН при сорбции белка на смоченную мембрану и глицерина при нанесении на сухую мембрану позволило существенно увеличить чувствительность анализа (рис. 2). Мы также установили, что интенсивность цветового сигнала, обусловленного скоплением тёмноокрашенных наночастиц на небольшом участке мембраны, не коррелирует с величиной T_2 . В ряде опытов мы варьировали объёмы и концентрацию наносимого на мембрану белка. Сорбция малого объёма белка в высокой концентрации ожидаемо привела к появлению ярко окрашенного пятна, тогда как сорбция такого же количества белка, но в большем объёме, способствовала существенному снижению цветового сигнала.

Для измерения времени релаксации протонов существенна также величина площади мембраны, в которой находятся наночастицы. Наиболее предпочтительна ситуация, при которой сорбция белков производится на участок мембраны, сопоставимый по размеру с площадью катушки прибора, размеры которой составляли 6×6 мм. Нанесение на мембрану менее концентрированного, но большего по объёму раствора антилиганда, явилось оптимальным условием для достижения более высокой чувствительности твёрдофазного ЯМР-анализа, что мы показали в экспериментах, результаты которых представлены на рис. 3. Мембрану сенсibilizировали одинаковым количеством IgG (200 нг). В одном случае наносимый на мембрану объём составлял 2 мкл, в другом — 20 мкл. Интенсивность окрашивания была выше в первом случае, а вот снижение T_2 , напротив, во втором. При нанесении на мембрану IgG в объёме 20 мкл размер сенсibilizированного участка мембраны был практически идентичен размерам катушки, что и привело к возрастанию сигнала при ЯМР-анализе.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что при разработке иммуносорбентов для твёрдофазного ЯМР-анализа необходимо использовать подходы, отличные от тех, что применяются при конструировании традиционных иммуноаналитических дот-тестов, основанных на формировании окрашенных точек, пятен, полосок и т.д. Оптимальным является увеличение объёма наносимого на твёрдую фазу антилиганда и добавление в сорбционный буферный раствор агентов, обеспечивающих проникновение молекул

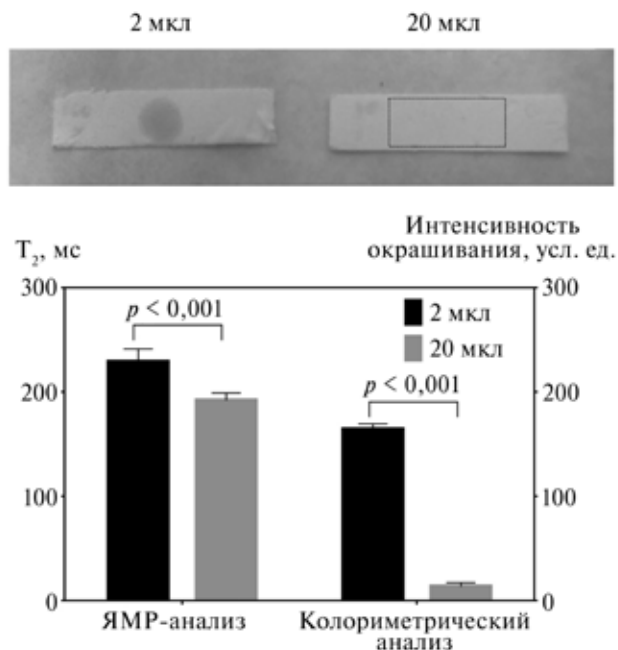


Рис. 3. Влияние объёма наносимого белка на интенсивность окрашивания точки и время релаксации. На мембрану наносили равное количество IgG — 200 нг. В верхней части рисунка показан внешний вид тест-полосок после обработки конъюгатом Fe@C-NH₂/BCA/G-белок. Пунктирная линия ограничивает участок мембраны, на который сорбировали IgG.

антилиганда в толщу мембраны и их равномерное распределение.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 17–15–01116.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blümich B. Introduction to Compact NMR: A Review of Methods // TrAC — Trends Anal. Chem. 2016. V. 83. P. 2–11.
2. Luo Z.-X., Fox L., Cummings M., Lowery T.J., Daviso E. New Frontiers in *in vitro* Medical Diagnostics by Low Field T2 Magnetic Resonance Relaxometry // TrAC — Trends Anal. Chem. 2016. V. 83. P. 94–102.
3. Chen Y.-T., Kolhatkar A.G., Zenasni O., Xu S., Lee T.R. Biosensing Using Magnetic Particle Detection Techniques // Sensors (Switzerland). 2017. V. 17. № 10. 2300.
4. Alcantara D., Lopez S., García-Martin M.L., Pozo D. Iron Oxide Nanoparticles as Magnetic Relaxation Switching (MRSw) Sensors: Current Applications in Nanomedicine // Nanomed.: Nanotechnol., Biol., and Med. 2016. V. 12. № 5. P. 1253–1262.
5. Zhang Y., Yang H., Zhou Z., Huang K., Yang S., Han G. Recent Advances on Magnetic Relaxation

- Switching Assay-Based Nanosensors // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. № 4. P. 869–879.
6. *Schrittwieser S., Pelaz B., Parak W.J., Lentijo-Mozo S., Soulantica K., Dieckhoff J., Ludwig F., Guenther A., Tschöpe A., Schotter J.* Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels // *Sensors (Switzerland)*. 2016. V. 16. № 6. P. 828.
 7. *Mikhalev K.N., Germov A.Yu., Uimin M.A., Yermakov A.E., Konev A.S., Novikov S.I., Gaviko V.S., Ponosov Yu. S.* Magnetic State and Phase Composition of Carbon-Encapsulated Co@C Nanoparticles According to ^{59}Co , ^{13}C NMR Data and Raman Spectroscopy // *Materials Res. Express*. 2018. V. 5. № 5. 055033.
 8. *Grass R.N., Athanassiou E.K., Stark W.J.* Covalently Functionalized Cobalt Nanoparticles as a Platform for Magnetic Separations in Organic Synthesis // *Angew. Chem. — Intern. Ed.* 2007. V. 46. P. 4909–4912.
 9. *Raev M.B., Khramtsov P.V., Bochkova M.S.* Investigation into Size Distribution of Carbon Nanoparticles Covalently Functionalized with Proteins // *Nanotechnol. in Russia*. 2015. V. 10. № 1/2. P. 140–148.
 10. *Low S.C., Shaimi R., Thandaithabany Y., Lim J.K., Ahmad A.L., Ismail A.* Electrophoretic Interactions between Nitrocellulose Membranes and Proteins: Biointerface Analysis and Protein Adhesion Properties // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. V. 110. P. 248–253.
 11. *Hoffman W.L., Jump A.A., Kelly P.J., Ruggles A.O.* Binding of Antibodies and Other Proteins to Nitrocellulose in Acidic, Basic, and Chaotropic Buffers // *Anal. Biochem.* 1991. V. 198. № 1. P. 112–118.
 12. *Mujawar L., Van Amerongen A., Norde W.* Influence of Pluronic F127 on the Distribution and Functionality of Inkjet-Printed Biomolecules in Porous Nitrocellulose Substrates // *Talanta*. 2015. V. 131. P. 541–547.
 13. *Van Lieshout R.M.L., Van Domburg T., Saalmink M., Verbeek R., Wimberger-Friedl R., Van Dieijen-Visscher M.P., Punyadeera C.* Three-dimensional Flow-through Protein Platform // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 13. P. 5165–5171.
 14. *Qiu S., Song C., Zhao S., Li J., Zeng H., Wu S., Guo H., Li H., Liu C., Liu Q.* A New Spot Quality Control for Protein Macroarray Based on Immunological Detection // *Talanta*. 2015. V. 138. P. 176–182.
 15. *Saha D., Acharya D., Dhar T.K.* Method for Homogeneous Spotting of Antibodies on Membranes: Application to the Sensitive Detection of Ochratoxin A // *Anal. and Bioanal. Chem.* 2006. V. 385. № 5. P. 847–854.

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOSORBENT FOR SOLID-PHASE NMR-BASED ASSAY

**P. V. Khramtsov^{1,2}, M. D. Kropaneva¹, M. S. Bochkova¹,
V. P. Timganova¹, S. A. Zamorina^{1,2}, M. B. Rayev^{1,2}**

¹Perm Federal Research Center Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

²Perm State University, Perm, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev August 7, 2018

Received September 27, 2018

The conditions for constructing an immunosorbent reagent for solid-phase NMR analysis were optimized. For this purpose, we increased the area of the sensitized portion of the membrane to fit the relaxometer coil size and added the agent sorption buffer. This provided the penetration of the anti-ligand molecules into the membrane thickness and their uniform distribution.

Keywords: nuclear magnetic resonance; magnetic nanoparticles; assay; conjugate.