

Модифікація поверхні імунного біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу при аналізі нонілфенолу

А. В. Демченко, М. Ф. Стародуб

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 04030, Україна

nikstarodub@yahoo.com

*Досліджено вплив стану поверхні перетворювача імунного біосенсора, заснованого на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР), на чутливість і стабільність його відгуку при прямому визначенні нонілфенолу в розчинах. Поверхню сенсора було модифіковано за допомогою поліелектролітів, додекантіолу, а також сульфату декстрану та глутарового альдегіду. Показано, що найбільшої чутливості (10 нг/мл) та стабільності відгуку біосенсора можна досягти при модифікації поверхні додекантіолом та за умови створення проміжного шару з білка А із *Staphylococcus aureus* для орієнтації специфічних антитіл активними центрами у бік розчину.*

Ключові слова: нонілфенол, імунний біосенсор, поліелектроліти, додекантіол, глутаровий альдегід (ГА), сульфат декстрану (СД).

Вступ. Велика кількість промислових хімічних речовин є забруднювачами довкілля, що негативно впливає на здоров'я людини через порушення нормального функціонування ендокринної системи. Такі речовини називають ендокринними руйнівниками, до яких належать і деякі алкілфеноли, у тому числі нонілфенол (НФ). Мішенню для цих речовин слугують ядерні рецептори стероїдних гормонів, через які відбувається регуляція ембріонального розвитку та фізіологічних процесів у дорослих особин щурів [1]. Обробка нервових стовбурових клітин НФ протягом 24 год призводить до різкого пригнічення клітинного росту. 4-НФ виявляє потужну цитотоксичну дію за рахунок апоптозу через каспазний каскад і блокування клітинного циклу у фазі G2/M [2]. НФ є досить поширеним забруднювачем навколишнього середовища. Його виявляють у придонних і поверхневих водах. Ос-

татні дослідження показали високу токсичність НФ і його здатність накопичуватися у водних організмах [3].

Більшість відомих тестів для визначення нонілфенолу є занадто дорогими і довготривалими, щоб сформувати базу для створення програм із нагляду за екологічною ситуацією при аналізі великої кількості зразків [4—7]. Необхідність у швидких, недорогих, надійних і чутливих підходах для моніторингу мікрокількостей забруднюючих речовин і, зокрема, НФ у воді та для визначення токсичності відходів, що надходять у довкілля, вимагає розробки альтернативних інструментальних аналітичних засобів, що може бути успішно досягнуто при використанні принципів біосенсорики. На даний момент описано деякі відповідні підходи.

Так, раніше нами розроблено один із варіантів оптичного імунного біосенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу (ППР), що дозволяє визначати НФ методом «конкуренції» з

чутливістю 7—10 нг/мл (де «вільний» НФ, який знаходився у досліджуваних розчинах, конкурував з НФ, іммобілізованим на поверхні перетворювача, за специфічні сайти зв'язування на антитілах, у результаті чого спостерігалось зменшення зсуву резонансного кута) та методом «донасичення» з чутливістю 2—5 нг/мл (після проходження імунної реакції між НФ і специфічними антитілами проводили «донасичення» НФ, що не прореагував, додаючи антисироватку в концентрації 10 мг/мл; при цьому відбувався зсув резонансного кута, величина якого була пропорційною концентрації вільного новілфенолу в розчині) [8].

Також повідомлялося про розробку імунного ППР біосенсора на базі стаціонарного приладу Біосеге, що дозволяє визначати НФ методом «конкуренції» при концентрації 2—5 нг/мл [9], та досить чутливого ППР біосенсора, який базується на взаємодії НФ з естрогеновим рецептором [10]. Є відомості про створення амперометричного імуносенсора, що забезпечує визначення НФ з чутливістю 10 нг/мл, але потребує використання мічених антитіл і спеціальних високоефективних барвників. Проте слід зазначити, що вищеописані методи є відносно складними, оскільки вимагають використання додаткових реактивів і етапів аналізу та є дуже вартісними.

Так, наприклад, прилад Біосеге коштує більш ніж 500 тис. євро. Отже, є необхідність у розробці більш простих та дешевих, але досить чутливих інструментальних засобів для визначення НФ, придатних для використання у польових умовах. Успіх такої розробки лежить не стільки в площині електроніки, скільки у підборі адекватних методів біохімічної обробки поверхні перетворювача для оптимізації високочутливої реєстрації генерованого оптичного сигналу при взаємодії антигену з антитілами чи навпаки. Фірма «Pharmacia» (Швеція) для цього використала розгалужений декстран, що було предметом спеціального патенту [9]. Разом з тим зауважимо, що такий метод підготовки поверхні не є простим і дешевим, а тому необхідність у пошуку нових варіантів, які були б оригінальними та задовольняли потреби практики у використанні портативних і напівпортативних біосенсорних пристроїв у польових умовах, є на часі.

Метою даної роботи був аналіз чутливості оптичного імунного біосенсора на основі ППР і антитіл, специфічних до НФ, в разі прямого визначення НФ у розчинах та відпрацювання оптималь-

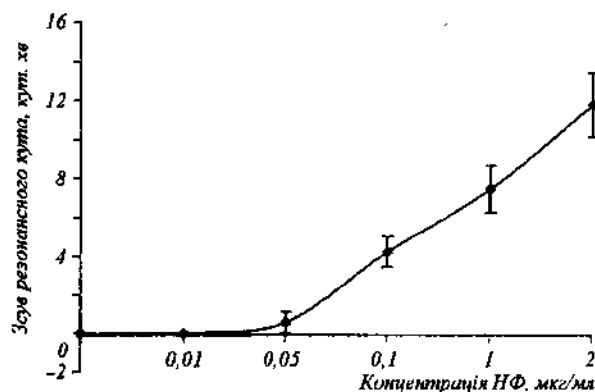


Рис. 1. Відгуки імунного біосенсора на внесення різних концентрацій НФ у вимірювальну комірку в разі необробленої поверхні трансдюсера

них варіантів модифікації поверхні перетворювача для підвищення чутливості і стабільності відгуку біосенсора. Для модифікації поверхні застосовували поліелектроліти, додекантіол, сульфат декстрану та глутаровий альдегід (ГА).

Матеріали і методи. Дослідження виконували на приладі Плазмон-Spr-4М. Робота приладу базується на використанні явища ППР, його функціонування детально представлено раніше [8, 12]. Всі експерименти проводили в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 7,4.

Для «прямого» визначення НФ використовували антисироватку, одержану проти кон'югата НФ—БСА, в концентрації 10 мг/мл (її встановлено в попередніх дослідженнях [8]). Спочатку у вимірювальну комірку вносили 0,01 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, для отримання базової лінії, а потім на поверхню перетворювача біосенсора наносили антисироватку і витримували протягом 20 хв, після чого за допомогою трис-НСІ буфера відмивали антитіла, які не іммобілізувалися фізичною сорбцією. Далі на поверхню наносили 1 %-й розчин желатину для заповнення «вільних» місць зв'язування, після чого у вимірювальну комірку додавали розчини НФ у різних концентраціях і будували калібрувальну криву (рис. 1).

Відповідно до мети роботи наступним її етапом було визначення впливу модифікації поверхні перетворювача поліелектролітами і орієнтації антитіл за допомогою білка А на чутливість визначення НФ у розчинах. Для цього на поверхню перетворювача спочатку іммобілізували поліаліламіногідро-

хлорид (ПАА) («Aldrich», США) з розчину, що мав концентрацію 1 мг/мл, а потім білок А у концентрації 1 мг/мл. Після цього антитіла іммобілізували з розчину антисироватки (10 мг/мл) і далі вносили розчини НФ у концентрації від 10 нг/мл до 2 мкг/мл.

При модифікації поверхні перетворювача ППР біосенсора за допомогою додекантіолу його 98 %-й розчин спочатку витримували на поверхні протягом 18 год, а потім поверхню перетворювача відмивали 40 %-м етиловим спиртом. На цій поверхні здійснювали іммобілізацію білка А з розчину, що мав концентрацію 1 мг/мл. «Пряме» визначення НФ проводили описаним вище способом.

Надалі поверхню модифікували за допомогою сульфату декстрану і ГА. Спочатку у вимірювальну комірку вносили 0,01 М фосфат-цитратний буфер, рН 4,0, для отримання базової лінії і на поверхні іммобілізували антитіла (з розчину антисироватки у фосфат-цитратному буфері при концентрації 10 мг/мл). Потім на поверхню наносили розчин сульфату декстрану (у фосфат-цитратному буфері з концентрацією 1 мг/мл) і відмивали молекули, які не іммобілізувалися, за допомогою цього ж буфера. Зазначену процедуру повторювали ще раз, а потім втретє наклали антитіла. Отримані шари антитіла зшивали внесенням 0,5 %-го розчину глутарового альдегіду. Сульфат декстрану вимивали забуференим фізрозчином (ЗФР) (рН 7,4) і «вільні» місця зв'язування заповнювали 0,5 %-м розчином желатину у ЗФР. Після чого додавали розчини НФ з різною концентрацією.

Результати і обговорення. Відповідно до вищеописаної методики було показано принципову можливість «прямого» визначення НФ з чутливістю 80–100 нг/мл і побудовано калібрувальну криву (рис. 1). «Прямий» метод визначення НФ за допомогою ППР імуносенсора є досить простим у виконанні, однак він недостатньо чутливий. Тому для досягнення високої чутливості і стабільності результатів було проведено низку досліджень з модифікації поверхні сенсора.

Для іммобілізації біологічного матеріалу чи відокремлення вихідних компонентів від продуктів імунної реакції широко використовують поліелектроліти [13]. Одержання плівок за допомогою невеликих заряджених органічних молекул дуже розповсюджене, оскільки ці молекули сорбуються на зарядженій поверхні і утворюють нерозчинний полімер, здатний до електростатичної сорбції молекул

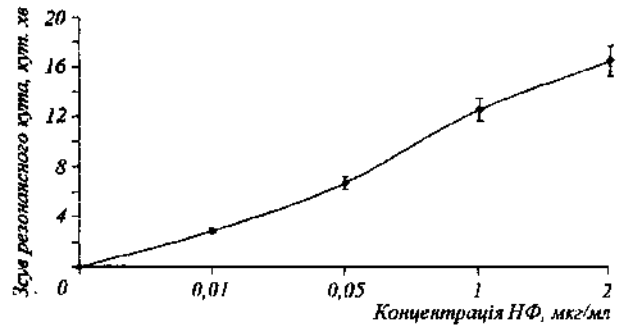


Рис. 2. Відгуки імунного біосенсора на внесення різних концентрацій НФ у вимірювальну комірку в разі попереднього нанесення на поверхню перетворювача шарів з ПАА/білка А/антисироватки

з протилежним зарядом [14]. Зокрема, іммобілізація на поверхні сенсора ПАА забезпечує створення позитивного заряду.

Збільшити відгук біосенсора можна за рахунок представлення на його поверхні максимально щільного шару специфічних імуноглобулінів, орієнтованих у розчин структурами, які розпізнають антиген. Якщо поліелектролітні проміжні шари надають можливість досягти відповідної щільності іммобілізації імуноглобулінів на поверхні перетворювача, то їхня орієнтація може бути зумовлена формуванням додаткового проміжного шару (між поліелектролітами та імуноглобулінами) з білка А, отриманого із *Staphylococcus aureus* [13]. Останній, зв'язуючи сайт на імуноглобулінах у ділянці Fc-фрагмента, сприяє експонуванню його F(ab)₂-фрагментів у розчин. Нами продемонстровано, що застосування для модифікації поверхні ПАА та білка А дозволяє підвищити чутливість біосенсора до 50 нг/мл (рис. 2).

В іншому випадку для отримання стабільних результатів аналізу і збільшення чутливості біосенсора його поверхню модифікували за допомогою додекантіолу. SH-групи додекантіолу взаємодіють з іонами металу, утворюючи меркаптани. В результаті поверхня «рівномірно» (з деякою вірогідністю) вкривається гідрофобним шаром, здатним до взаємодій з молекулами (в даному випадку — молекулами білка А, іммобілізованого на поверхні для орієнтації антитіл). Ця модифікація дозволяє визначати НФ з чутливістю 10 нг/мл (рис. 3).

Застосовано також метод іммобілізації антитіл на поверхні золота імунного біосенсора на основі ППР за участі сульфату декстрану, який здатний формувати на поверхні специфічний тривимірний комплекс [13]. У цьому разі послідовно чергували

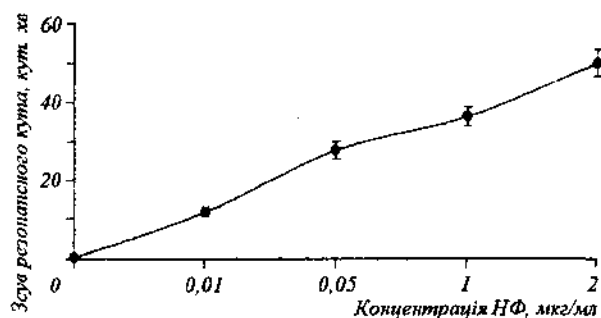


Рис. 3. Відгуки імунобіосенсора на внесення різних концентрацій НФ у вимірювальну комірку в разі попередньої обробки поверхні перетворювача додекантіолом.

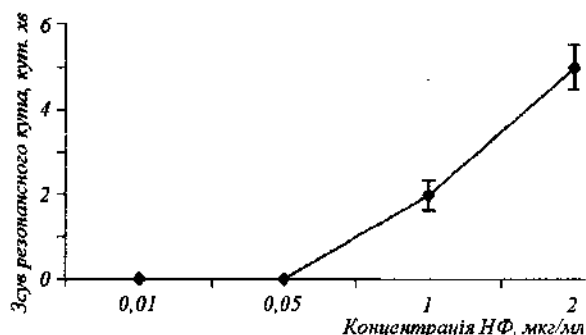


Рис. 4. Відгуки імунобіосенсора на внесення різних концентрацій НФ у вимірювальну комірку у разі попередньої обробки поверхні перетворювача сульфатом декстрану та глутаровим альдегідом

Відгуки імунобіосенсора на внесення різних концентрацій нонілфенола за умови застосування різних способів модифікації поверхні при «прямому» визначенні НФ в розчинах

Спосіб модифікації поверхні перетворювача ППР імунобіосенсора	Концентрація нонілфенола, мкг/мл			
	0,01	0,05	1	2
Немодифікована поверхня	0	0,6±0,28	7,6±0,71	11,8±1,13
Модифікація поверхні за допомогою				
ПАА та білка А	3±0,63	7,1±0,89	13±1,32	16,8±1
додекантіолу та білка А	12,1±0,41	28,3±1,02	37±1,33	51,2±1,51
глутарового альдегіду і сульфату декстрану	0	0,21±0,12	2,1±0,35	4,6±0,62

сорбцію антитіл і натрієвої солі сульфату декстрану та ковалентне зв'язування антитіл за допомогою ГА і вимивання декстрану із уже сформованої поверхні. Антитіла є позитивно зарядженими при рН нижче за їхню ізоелектричну точку, а СД являє собою поліаніон. Сформована таким чином біологічна мембрана має в декілька разів більшу розгалуженість селективних структур порівняно з простою фізичною сорбцією антитіл. Проте нами встановлено, що така модифікація поверхні не-ефективна, оскільки відгук сенсора на внесення антигену є меншим, ніж при проведенні дослідів на немодифікованій поверхні, а чутливість складає близько 1,5 мкг/мл (рис. 4). Очевидно, це пов'язано з порушенням третинної структури антитіл при обробці їх ГА і відповідно з інактивацією їхніх активних центрів.

Надалі визначали вплив стану поверхні перетворювача ППР імунобіосенсора на стабільність його відгуку при «прямому» визначенні нонілфенолу в розчинах, порівнюючи відгуки сенсора на внесення однакових концентрацій НФ (таблиця). Виявлено, що найстабільніші результати відповідали модифікації поверхні додекантіолом.

Висновки. Таким чином, встановлено принципову можливість «прямого» визначення НФ і досліджено вплив модифікації поверхні імунобіосенсора на чутливість і стабільність його відгуку. Показано, що ефективна товщина шару іммобілізованих імуноних компонент, а також сформованого специфічного імуноного комплексу на золотій поверхні ППР суттєво збільшується в ряду: їхня пряма фізична сорбція на золотій поверхні з проміжним шаром поліелектролітів і зв'язування білком А, попередньо іммобілізованим на тому ж шарі → іммобілізація на поверхні, попередньо модифікованої за допомогою додекантіолу. Найстабільніші результати отримано при модифікації поверхні додекантіолом.

Отже, цей спосіб модифікації є рекомендованим. Варто зауважити, що «прямий» метод визначення НФ за допомогою ППР імунобіосенсора із застосуванням модифікації поверхні перетворювача додекантіолом і орієнтації антитіл за допомогою білка А є досить простим і водночас чутливим (10 нг/мл), а також він у 100 разів дешевший, ніж метод на основі ППР з використанням сенсора Biosore.

З викладеного вище випливає, що зазначений метод можна успішно застосовувати у польових умовах і масово використовувати на практиці, зокрема, промисловими підприємствами для контролю стічних вод.

A. V. Demchenko, M. F. Starodub

Modification of immune SPR biosensor surface at nonylphenol analysis

Summary

The influence of the state of transducer surface of immune SPR biosensor on the sensitivity and stability of its «direct» detection of nonylphenol in solutions has been investigated. The biosensor surface was modified with polyelectrolytes, dodecanethiol, and dextran sulfate and glutaraldehyde. It was shown that the highest sensitivity (up to 10 ng/ml) and stability of the biosensor response were achieved at the surface modification with dodecanthiol and simultaneous creation of intermediate layer with protein A *Staphylococcus aureus* for the orientation of active sites of specific antibodies toward solution.

Keywords: nonylphenol, immune biosensor, polyelectrolytes, dodecanethiol, dextran sulfate, glutaraldehyde.

A. B. Демченко, Н. Ф. Стародуб

Модификация поверхности иммунного биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса при анализе нонилфенола

Резюме

Исследовано влияние состояния поверхности преобразователя иммунного биосенсора, основанного на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, на чувствительность и стабильность его отклика при прямом определении нонилфенола в растворах. Поверхность биосенсора модифицировали при помощи полиэлектролитов, додекантиола, а также глутарового альдегида и сульфата декстрана. Показано, что наибольшая чувствительность (10 нг/мл) и стабильность отклика биосенсора достигается при модификации поверхности додекантиолом и одновременном создании промежуточного слоя из белка *A Staphylococcus aureus* для ориентации активных центров специфических антител в сторону раствора.

Ключевые слова: нонилфенол, иммунный биосенсор, полиэлектролиты, додекантиол, глутаровый альдегид (ГА), сульфат декстрана (СД).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Laws S. C., Carey S. A., Ferrell J. M., Bodman G. J., Cooper R. L. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats // *Toxicol. Sci.*—2000.—54.—P. 154—167.
2. Masuyama H., Hiramatsu Y., Kunitomi M., Kudo T., MacDonald P. N. Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate pregnane X receptor-mediated transcription // *Mol. Endocrinol.*—2000.—14.—P. 421—428.
3. Soto A. M., Justicia H., Wray J. W., Sonnenschein C. p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from «modified» polystyrene // *Environ. Health Perspect.*—1991.—N 92.—P. 167—173.
4. Estevez-Alberola M.-C., Marco M.-P. Immunochemical determination of xenobiotics with endocrine disrupting effects // *Anal. and Bioanal. Chem.*—2004.—378.—P. 563—575.
5. Bettermann A. D., Lazorchak D., Dorofi J. C. Profile of toxic response to sediments using whole-animal and *in vitro* sub-mitochondrial particle (SMP) assays // *Environ. Toxicol. and Chem.*—1996.—3.—P. 319—324.
6. Dzantiev B. B., Zherdev A. V., Romanenko O. G., Sapogova L. A. Development and comparative study of different immunoenzyme techniques for pesticides detection // *Int. J. Environ. Anal. Chem.*—1996.—65.—P. 95—111.
7. Стародуб Н. Ф., Пивень Н. В., Демченко А. В. Иммуноферментный анализ неионных поверхностно активных веществ в воде // *Укр. біохім. журн.*—2005.—77, № 6.—С. 116—121.
8. Стародуб Н. Ф., Демченко А. В., Пивень Н. В. Разработка новых методов контроля качества воды // *Химия и технология воды.*—2005.—27, № 6.—С. 591—599.
9. Samsonova J. V., Uskova N. A., Andreyuk A. N., Elliott C. T. Biocore biosensor immunoassay for 4-nonylphenols: assay optimization and applicability for shellfish analysis // *Chemosphere.*—2004.—57.—P. 975—985.
10. Usami M., Mitsunaga K., Ohno Y. Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor // *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.*—2002.—81.—P. 47—55.
11. Evtugyn G. A., Eremin S. A., Shaljamova R. P., Ismagilova A. R., Budnikov H. C. Amperometric immunosensor for nonylphenol determination based on peroxidase indicating reaction // *Biosensors and Bioelectronics.*—2006.—22.—P. 56—62.
12. Пирогова Л. В., Стародуб М. Ф., Артюх В. П., Нагаева Л. І., Добросол Г. І. Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу // *Укр. біохім. журн.*—2002.—74, № 3.—С. 88—92.
13. Starodub N. F., Pirogova L. V., Demchenko A., Nabok A. V. Antibody immobilisation on the metal and silicon surfaces. The use of self-assembled layers and specific receptors // *Bioelectrochemistry.*—2004.—66.—P. 111—116.
14. Starodub N. F., Nabok A. V., Starodub V. M., Ray A. K., Hassan A. K. Immobilisation of biocomponents for immune optical sensors // *Ukr. Biochem. J.*—2001.—73, N 4.—P. 16—24.

УДК 543.395:543.424:577.354
Надійшла до редакції 30.01.06