

Разработка потенциометрического иммуносенсора для определения интерферона

Т. А. Сергеева*, А. П. Солдаткин, А. Э. Рачков, М. И. Терещенко, С. А. Пилецкий, А. В. Ельская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев ул. Академика Заболотного, 150

Разработан иммуноферментный сенсор для определения рекомбинантного интерферона α_2 человека на основе pH-чувствительных полевых транзисторов. Датчик дает возможность определения рекомбинантного α_2 интерферона в пределах концентраций 10—200 мкг/мл. Предложенный метод позволяет на порядок сократить время анализа по сравнению с традиционными методиками ELISA. Продемонстрирована возможность определения концентрации интерферона в культуральной среде. Полученные данные хорошо согласуются с результатами иммуноферментного анализа. Исследована вероятность многократного использования иммуноферментного сенсора.

Введение. В последнее время α_2 -интерферон широко используется в медицинской практике для лечения вирусных и онкологических заболеваний [1—3]. Широкому клиническому применению интерферона ранее препятствовал крайне низкий его выход при получении обычными методами, т. е. преимущественно из донорской крови человека.

Поэтому в лабораториях ряда стран прилагались серьезные усилия к тому, чтобы получать интерферон с помощью генноинженерных методов. В середине 70-х годов такие методы были разработаны. Контроль биотехнологических процессов получения интерферона выдвигает задачу разработки быстрых и эффективных способов его количественного определения. Традиционное количественное определение интерферона основано на оценке подавления вирусной активности. Однако, несмотря на высокую чувствительность, эти методы сложны в исполнении, трудоемки, не дают информации о типовой принадлежности исследуемого образца, продолжительны во времени, дорогостоящи. Альтернативой им являются иммунохимические методы, в первую очередь, радиоиммунный и твердофазный иммуноферментный анализ. Использование последних позволяет упростить анализ, сократить его время до 5—6 ч [4—6].

Современные потребности медицины и контроля биотехнологических процессов требуют разработки и создания аналитических систем, сочетающих высокую специфичность и чувствительность определения с коротким (минуты) временем детектирования, удобством, простотой и миниатюрностью. Всеми этими преимуществами обладают новые биотехнологические устройства — иммуносенсоры, в которых преобразователь сигнала, возника-

*Correspondence address.

ющего в процессе биохимического распознавания определенного агента, находится в непосредственном контакте с иммобилизованным высокоспецифичным рецептором, представляющим собой антиген или антитело в зависимости от цели анализа и его схемы.

Использованный нами подход при разработке потенциометрического иммуносенсора для определения концентрации интерферона основывается на применении конъюгатов антиинтерфероновых антител с β -лактамазой, способной расщеплять субстрат с выделением протонов, и рН-чувствительных полевых транзисторов (рН-ПТ) с иммобилизованным на их поверхности интерфероном в качестве датчика для оценки реакции антиген — антитело.

Материалы и методы. В работе использовали генноинженерную β -лактамазу TEM-1 из *Escherichia coli* (EC 3.5.2.6), генноинженерный лейкоцитарный α_2 -интерферон, моноклональные антитела IF1/92 производства ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия), кроличьи поликлональные антитела против генноинженерного лейкоцитарного интерферона α_2 человека (IgG-фракция, полученная очисткой на DEAE-целлюлозе фирмы «Whatman», Великобритания), рН-чувствительные полевые транзисторы 50 мВ/рН (Инновационный центр «Эмокон», Киев).

Конъюгирование антител с β -лактамазой. 2,5 мг поликлональных антиинтерфероновых антител и 5 мг β -лактамазы растворяли в 1 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 6,8, и диализировали против этого буфера в течение ночи при 4 °С. Добавляли 1 %-й раствор глутарового альдегида до конечной концентрации 0,05 %. Инкубация в течение 3 ч при комнатной температуре. Далее добавляли L-лизин до 4 % и инкубировали при тех же условиях еще на протяжении 2 ч. Смесь в течение ночи диализировали при 4 °С против 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,2, содержащего 0,15 М NaCl. Полученный конъюгат осветляли центрифугированием при 12 000 об/мин в течение 3 мин. Добавляли глицерин до 50 %, БСА — до 5 мг/мл. Хранение при —20 °С.

Рабочее разведение конъюгата подбирали в иммуноферментном анализе с использованием смеси I₂, KI, крахмала и Na-соли бензилпенициллина как субстрата. Оптическую плотность определяли при длине волны 620 нм с помощью микрофотоколориметра Multiscan MCC 340 («Labsystems», Финляндия).

Иммобилизация биоматериала на затворном диэлектрике полевого транзистора. Иммобилизацию биоматериала на поверхности рН-ПТ осуществляли двумя способами.

1. Сорбция белка на матрице БСА: 10 мг БСА растворяли в 100 мкл раствора β -лактамазы (интерферона) в 2 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 150 мМ NaCl (концентрация фермента 0,2 мг/мл, концентрация интерферона 1 мг/мл). Полученный раствор наносили капельным методом на затворный диэлектрик полевого транзистора. На контрольный полевой транзистор, необходимый для компенсации неспецифических эффектов, наносили раствор БСА в концентрации 100 мг/мл в 2 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl. Транзисторы с нанесенными мембранами инкубировали в течение 30 мин в парах глутарового альдегида.

2. Ковалентная пришивка к затворному диэлектрику рН-ПТ: поверхность рН-ПТ, предварительно обработанную хромовой смесью и раствором щелочи, активировали инкубацией в парах γ -аминопропил-триэтоксисилана (24 ч) и в течение 4 ч — в парах глутарового альдегида. После этого на поверхность транзистора капельным методом наносили раствор β -лактамазы (интерферона) в концентрации 1 мг/мл. На контрольный полевой транзистор наносили БСА в той же концентрации.

Измерительная схема и конструкция сенсора. В работе использовали полупроводниковые чипы, на каждом из которых расположена дифференциальная пара рН-ПТ. Конструкция датчика и схема измерений приведены в работе [7].

Иммуноферментный анализ. Для определения концентрации интерферона использовали «сэндвичный» вариант анализа. Моноклональные антитела к интерферону сорбировали на полистирольных планшетах для иммуноферментного анализа высушиванием из 2 %-го раствора NH_4HCO_3 в течение ночи при 37°C . Места неспецифического связывания блокировали инкубацией с раствором БСА в концентрации 2 мг/мл. Платы инкубировали с различными разведениями интерферона в 20 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl (PBS), в течение 1 ч при 37°C . После отмывки платы инкубировали с конъюгатом кроличьих антиинтерфероновых антител с β -лактамазой в разведении 1:200 в тех же условиях. После каждой из стадий планшеты отмывали в PBS, содержащем 0,05 % твина-20. В качестве субстратной смеси использовали смесь 0,1 % водорастворимого крахмала, 0,16 % KI, 0,006 % I_2 , 0,003 % бензилпенициллина (Na-соль).

Результаты и обсуждение. В качестве метки для создания иммуноферментного сенсора на основе рН-ПТ была выбрана β -лактамаза, обладающая следующими преимуществами перед другими ферментами: 1) односубъединичная структура; 2) малая молекулярная масса — около 28 кДа; 3) свойство расщеплять субстрат — бензилпенициллин с образованием сильной кислоты, что дает возможность легко регистрировать реакцию связывания антигена с мечеными антителами; 4) высокая стабильность, в том числе термостабильность, как самого фермента, так и конъюгатов β -лактамазы с антителами (конъюгаты хранятся около года практически без потери активности); 5) высокая удельная активность в широком диапазоне рН.

Для подтверждения принципиальной возможности создания иммуноферментного сенсора с использованием β -лактамазной метки предварительно была предпринята попытка создания энзимосенсора на основе данного фермента и оценки его рабочих характеристик.

Фермент иммобилизовали на поверхности рН-ПТ в матрице БСА, как описано выше. Для компенсации неспецифических эффектов, например, реакции транзистора на изменения освещенности измерения проводили в режиме дифференциальной пары (относительно контрольного полевого транзистора, на который наносили БСА-матрицу без фермента).

Полученный энзимосенсор продемонстрировал возможность определения субстрата (Na-соли бензилпенициллина) в области концентраций 0,1—1,5 мМ (с линейным участком 0,1—0,75 мМ в линейных координатах и 0,1—1,5 мМ — на полулогарифмической шкале) (рис. 1).

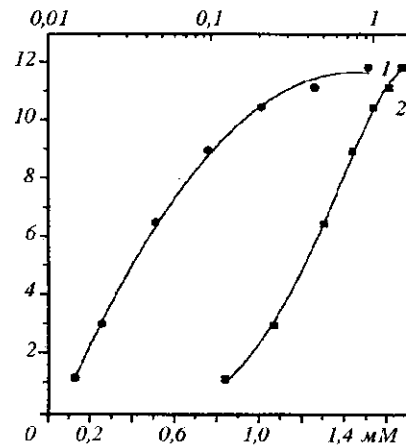


Рис. 1. Зависимость величины сенсорного отклика (мВ) β -лактамазного энзимосенсора от концентрации субстрата (Na-соли бензилпенициллина): 1 — линейная шкала; 2 — полулогарифмическая шкала. По оси ординат — сенсорный отклик, мВ

Следует отметить, что полученные зависимости величины отклика энзимосенсора от концентрации субстрата можно использовать для определения содержания основного вещества в препарате пенициллина. В отличие от традиционных [8] методов этот подход не является сложным, трудоемким, не требует большого количества реактивов и может быть успешно применен для определения бензилпенициллина в препарате антибиотика, а также для контроля технологического процесса его производства.

Время отклика датчика составляло всего 3—4 мин, а продолжительность функционирования — 14 сут без существенного снижения активности.

Детально исследовали оптимальные условия работы β -лактамазного сенсора: влияние pH, ионной силы и буферной емкости раствора (рис. 2—4). Максимальные отклики были получены в 2,5 мМ фосфатном буфере, pH 7,5, и при концентрации NaCl 150 мМ, т. е. оптимальные условия работы энзимосенсора близки к таковым проведения иммунохимической реакции.

В дальнейшем была предпринята попытка создания иммуносенсора с использованием интерферона и конъюгата β -лактамазы с антиинтерфероновыми антителами. Дифференциальная пара полевых транзисторов с иммобилизованным биоматериалом (интерферон на одном транзисторе, БСА на другом — контрольном) представляет собой биодатчик. Для определения оптимальной концентрации конъюгата антиинтерфероновых антител с β -лактамазой была исследована зависимость величины сенсорного отклика от концентрации конъюгата (рис. 5). Как видно, иммуносенсор

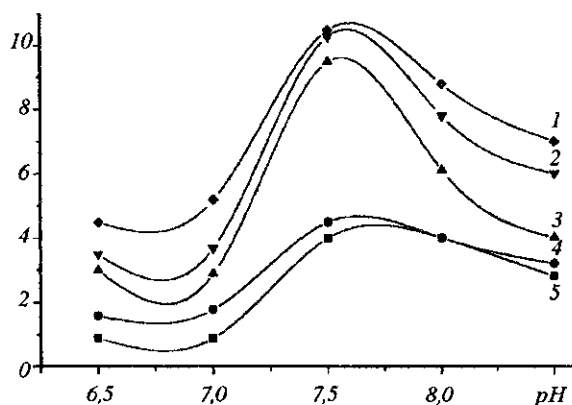


Рис. 2. Зависимость величины сенсорного отклика (мВ) β -лактамазного энзимосенсора от pH среды. Измерения проводили в 2,5 мМ Na-фосфатном буфере для концентрации субстрата: 1 — 1,25; 2 — 1; 3 — 0,75; 4 — 0,5; 5 — 0,25 мМ

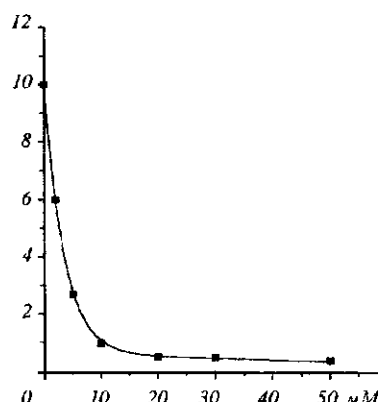
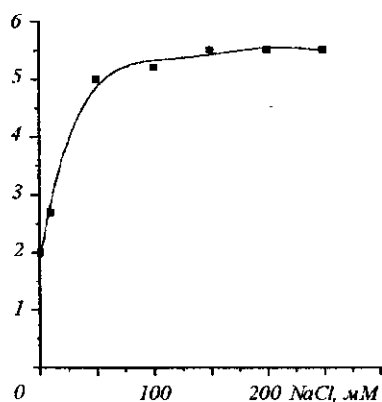
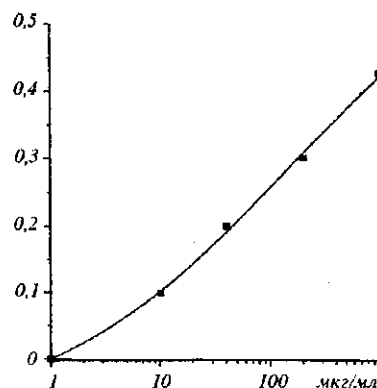


Рис. 3. Зависимость величины сенсорного отклика (мВ) β -лактамазного энзимосенсора от концентрации NaCl в среде. Измерения проводили в 2,5 мМ Na-фосфатном буфере при концентрации субстрата (Na-соли бензилпенициллина) 0,5 мМ

Рис. 4. Зависимость величины сенсорного отклика (мВ) β -лактамазного энзимосенсора от концентрации буфера. Концентрация субстрата (Na-соли бензилпенициллина) 0,5 мМ

Рис. 5. Зависимость величины иммуносенсорного отклика (мВ) от концентрации конъюгата антиинтерфероновых антител с β -лактамазой. На поверхности транзьюсера иммобилизован интерферон. Измерения проводили в 2,5 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5, 150 мМ NaCl



давал возможность определения концентрации конъюгата антиинтерфероновых антител с β -лактамазой в пределах 1 — 1000 мкг/мл.

Были изучены также оптимальные условия работы иммуноферментного сенсора. Показано, что для различных величин pH и концентраций буфера зависимости были подобны таковым для иммобилизованного фермента. Однако увеличение ионной силы, приводящее к усилению сенсорного отклика в случае иммобилизованного фермента, значительно снижало величину иммуносенсорного отклика. Это можно объяснить тем, что увеличение ионной силы раствора ведет к частичной десорбции конъюгата, специфически связавшегося с иммобилизованным на поверхности транзьюсера интерфероном, за счет разрушения ионных связей, участвующих в стабилизации взаимодействия антиген — антитело. С другой стороны, положительно заряженные ионы Na^+ могут экранировать заряд отрицательно заряженной в таких условиях БСА-мембраны и, таким образом, замедлять диффузию протонов, образующихся в процессе работы фермента, к поверхности транзьюсера.

Следует отметить, что способ иммобилизации интерферона на затворном диэлектрике полевого транзистора не влиял на величину сенсорного сигнала, однако при иммобилизации путем ковалентной пришивки время сенсорного отклика сокращалось вдвое. Это выглядит вполне закономерным, поскольку диффузия субстрата и продукта (Na-соли бензилпенициллина и протонов) к поверхности полевого транзистора сквозь матрицу БСА требует большего времени, чем в случае ковалентно пришитого к поверхности интерферона.

Для определения концентрации интерферона использовали вариант анализа, основанный на конкуренции иммобилизованного на поверхности

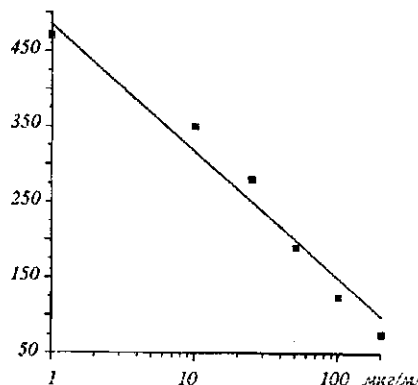


Рис. 6. Калибровочная кривая для определения концентрации интерферона в исследуемом образце в конкурентном варианте анализа. Измерения проводили в 2,5 мМ Na-фосфатном буфере, 150 мМ NaCl. По оси ординат — сенсорный отклик, мкВ

pH-ПТ и свободного (в исследуемой пробе) интерферона за связывание с антиинтерфероновыми антителами, меченными ферментом. Как результат, наблюдали снижение отклика сенсора, пропорциональное концентрации интерферона в исследуемой пробе в пределах 10—200 мкг/мл (рис. 6). Продемонстрирована возможность определения концентрации интерферона в культуральной среде. Полученные результаты хорошо согласовались с результатами иммуноферментного анализа (ошибка в пределах 10 %). Следует отметить, что предложенный метод уступает по чувствительности традиционному иммуноферментному анализу, однако позволяет сократить на порядок время анализа, является более технологичным, а достигнутая чувствительность достаточна для контроля биотехнологического процесса производства интерферона.

Как правило, при иммуносенсорном анализе используют один сенсорный чип для одного измерения. Это является недостатком данного метода, так как влечет за собой возрастание стоимости анализа, а также недостаточно высокую воспроизводимость метода при количественном анализе, что особенно важно.

Регенерация поверхности покрытого антигеном сенсора путем удаления связавшихся антител — один из подходов, дающих возможность решить эти проблемы. Комплекс антиген — антитело формируется за счет нековалентных связей (водородных, ионных, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных). Для эффективной диссоциации комплекса антиген — антитело необходимо уменьшить силу этих взаимодействий. В большинстве случаев для этого используют буферные растворы с высоким или низким значением pH, хаотропные агенты, поверхностно-активные вещества.

Растворы элюентов в иммуноферментном анализе подбирали, применяя в качестве твердой фазы полупроводниковые пластины Si_3N_4 , соответствующие поверхности pH-ПТ. Результаты, отражающие эффективность использования различных элюирующих растворов, представлены ниже:

| Буфер, используемый для элюции | Элюированный конъюгат, % |
|---|--------------------------|
| 20 мМ трис-HCl, pH 10 | 76 |
| 2 мМ трис-HCl, pH 8,0 | 2 |
| 10 % ДМФА | 79 |
| 3 М KSCN | 98 |
| 2 М KSCN | 76 |
| 6 М мочевины | 5 |
| 0,1 М цитратный буфер, pH 2,2 | 98 |
| 0,03 М цитратный буфер, pH 2,6 | 99 |
| 0,1 М глицин-HCl, pH 2,2 | 98 |
| 1 М уксусная кислота | 58 |
| 0,1 М глицин-HCl, pH 2,2 + + 2 % твин-20 | 83 |
| 2 мМ трис-HCl + 2 % твин-20 | 10 |

Как видно, наиболее эффективными элюирующими растворами являются буферы с низкими значениями pH. В дальнейшей работе для элюирования антител, связавшихся с антигеном, иммобилизованным на поверхности pH-ПТ, использовали 0,03 М цитратный буфер, pH 2,6.

После регенерации активной поверхности пластин тестирование способности иммобилизованного антигена к последующему взаимодействию со специфическими антителами проводили в ИФА.

Следует подчеркнуть, что обработка вышеуказанными элюирующими растворами практически не сказывается на функциональной активности

иммобилизованного антигена. Последний выдерживал 10 циклов связывания с конъюгатом без снижения активности.

Полученные результаты позволяют рассчитывать на многократное использование иммуноэнзимного сенсора.

Т. А. Сергеева, О. П. Солдаткин, О. Е. Рачков, М. И. Терещенко, С. А. Пилецкий, Г. В. Ельська

Розробка потенціометричного імуносенсора для визначення інтерферону

Резюме

Розроблено імуноферментний сенсор для визначення рекомбінантного інтерферону α_2 людини на основі рН-чутливих польових транзисторів. Датчик дає можливість визначення рекомбінантного інтерферону у межах концентрацій 10 — 200 мкг/мл. Запропонований метод дозволяє на порядок скоротити час аналізу порівняно з традиційними методиками ELISA. Продемонстровано можливість визначення концентрації інтерферону у культуральному середовищі. Отримані дані добре узгоджуються з результатами імуноферментного аналізу. Досліджено вірогідність багаторазового використання імуноферментного сенсора.

T. A. Sergeeva, A. P. Soldatkin, A. E. Rachkov, M. I. Tereschenko, S. A. Piletsky, A. V. El'skaya

Development of potentiometric immunosensor for interferon detection

Summary

The effective immunosensor for α_2 -interferon detection based on ion-sensitive field effect transistor has been developed. A specific sensing element is fabricated by immobilizing interferon on the gate of pH-sensitive field effect transistor (pH-FET). The interaction of anti-interferon antibodies labelled with β -lactamase with interferon-pH-FET (in the presence of specific enzyme substrate) leads to a local pH-change and produces electrochemical signal which is in proportion to the conjugate concentration. The main working characteristics of the sensor obtained have been estimated. The competitive electroimmunoassay has been employed for interferon detection in analysed solution. The sensor linear response to interferon concentration is obtained in the range 10—200 (μ g/ml). This gives a possibility of interferon detection in nondiluted cultural medium. The data of the competitive electroimmunoassay are in a good accordance with the ELISA ones. The possibility of regeneration of the immunosensor obtained has been shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Intron A recommended by EC committee // Appl. Genet. News.—1991.—11, N 12—P. 6.
2. Wong R., Morejon A., Ivonne O.R. et al. Treatment with human leukocyte interferon versus recombinant alpha 2 interferon in Cuban patients with combined infection HBsAG/VIH // Interferon Biotechnology: Symp. 1, Int. Conf. Ctr. (Apr. 17—22, 1989, Havana).— Havana, 1989.—P. S01—001.
3. Ludwig Ch. U. Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung von Interferonen in der Klinik // Schweiz. med. Wochenschr.—1989.—119, N 44.—S. 1539—1543.
4. Пилявская Е. А., Бабошко Ю. А. Иммуноферментная двухсайтовая тест-система для определения альфа-интерферона // Материалы науч. конф., посвященной 85-летию Томск. НИИ вакцин и сывороток НПО «Вирион».— Томск, 1991.—Ч. 2.—С. 40—42.
5. Иовлев В. И., Соловьева И. Е., Степанов А. Н. Количественное определение интерферона методом иммуноферментного анализа // Тр. Ленинград. НИИ эпидемиологии и микробиологии.—1988.—64.—С. 108—113.
6. Соловьева И. Е., Вербов В. Н., Кондратьева Г. А. Разработка иммуноферментного тестирования альфа-интерферона человека // Генно-инженер. человек. альфа-интерферон.—Л., 1988.—С. 101—105.
7. Boubriak O. A., Soldatkin A. P., Starodub N. F. Determination of urea in blood serum by urease biosensor based on an ion-sensitive field-effect transistor // Sensors and Actuators B.—1995.—N 26-27.—P. 429-431
8. Государственная фармакопея СССР.—М.: Медицина, 1968.—С. 980—982.

УДК 577.15.086:543

Поступила в редакцию 16. 11. 95