

УДК 57.088.1

Е. Г. Диригина<sup>1,2</sup>, А. Г. Буренин<sup>1,2</sup>, М. П. Никитин<sup>1,2</sup>, А. В. Орлов<sup>1,2</sup>,  
П. И. Никитин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

<sup>2</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

## Детекция в реальном времени аутоантител в сыворотке крови с помощью безметочной биосенсорной системы Пикоскоп<sup>®</sup>

Разработан иммуноанализ для детекции в реальном времени аутоантител в сложных средах с помощью безметочной биосенсорной системы Пикоскоп<sup>®</sup>. Работоспособность анализа экспериментально продемонстрирована на примере регистрации аутоантител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе в сыворотке крови человека. В экспериментах достигнуты клинически значимые пределы обнаружения антител.

**Ключевые слова:** Детекция биомолекул в сложных средах, безметочные методы, биосенсоры, сыворотка крови, антитела на тиреоглобулин, антитела на тиреопероксидазу.

### 1. Введение

Одним из основных методов лабораторной диагностики является определение маркеров заболеваний в крови и других биологических жидкостях. Необходимость регистрации молекул в сложных средах возникает и в других областях, например, при обнаружении патогенов в продуктах питания, детектировании различных химических веществ в задачах экологического мониторинга и т.д.

Современные меточные методы регистрации биомолекул и их взаимодействий, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) [1], радиоиммунный анализ [2], демонстрируют высокую чувствительность при детекции биомолекул в чистых растворах, однако их применение в сложных средах затруднено. Так, например, при оптической детекции собственная окраска или автофлуоресценция образца могут вносить свой вклад в регистрируемый сигнал, увеличивая шум и уменьшая, таким образом, отношение сигнал/шум [3, 4]. Кроме того, метка может разрушать сайты связывания, участвующие во взаимодействии антитела с антигеном, приводя к ложноотрицательным результатам. Более того, метка может и сама взаимодействовать с иммобилизованными на поверхности белками, что приводит к ложноположительным результатам [3].

Среди безметочных методов наиболее распространенным является метод поверхностного плазмонного резонанса [5]. Этот метод позволяет избежать проблем, связанных с использованием меток и, кроме того, проводить анализ проще и быстрее, а также наблюдать за всеми его этапами в реальном времени. Однако приборы, основанные на методе поверхностного плазмонного резонанса, а самое главное, расходные материалы к ним, слишком дороги для применений в рутинной медицинской диагностике. Кроме того, при работе с такими сложными образцами, как сыворотка крови, серьезным недостатком становится зависимость выходного сигнала от объемного показателя преломления анализируемой жидкости [5]. Как следствие, смена раствора вызывает скачок сигнала, соответствующий изменению объемного показателя преломления раствора. Этот скачок устраняется путем сшивки фрагментов сенсограммы компьютерной программой (или оператором), исходя из эвристических соображений (гладкости сенсограммы). При этом теряется точность отображения информации о динамике биохимических реакций на поверхности.

Общей проблемой для меточных и безметочных методов является неспецифическое связывание компонентов среды с реагентами и матрикс-эффект [6, 7]. Авторами были предложены высокочувствительные безметочные методы регистрации в реальном времени взаимодействий биомолекул, не зависящие от показателя преломления раствора и позволяющие использовать дешевые расходные материалы, а именно: микроскопные покровные стекла в качестве сенсорных чипов [8–12]. В данной работе продемонстрировано применение одного из этих методов для регистрации биомолекул в сложной среде на примере сыворотки крови. В качестве регистрируемых агентов использовались аутоантитела к тиреоглобулину и к тиреопероксидазе.

## 2. Безметочная биосенсорная система Пикоскоп®

В данной работе для детектирования антител в сыворотке крови была применена безметочная биосенсорная система Пикоскоп®, основанная на оригинальных оптических методах, разработанных в Институте общей физики им. А.М. Прохорова РАН [9]. Система позволяет в реальном времени количественно регистрировать протекание биохимических реакций по изменению в ходе реакции толщины биослоя на поверхности сенсорного чипа.

В основе работы системы Пикоскоп® лежит спектрально-корреляционный интерференционный метод [12]. Метод основан на оптической схеме, использующей широкополосное излучение и состоящей из двух интерферометров Фабри–Перо. База одного из интерферометров (расстояние между зеркалами) периодически изменяется с помощью пьезоэлектрического преобразователя, а в качестве второго интерферометра и одновременно сенсорного чипа служит плоскопараллельная стеклянная пластина (микроскопное покровное стекло), вдоль поверхности которой пропускают исследуемые растворы. Для измерений используется интерференция между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и лучом, отраженным от поверхности раздела «биослой – вода». Результат интерференции зависит от фазовой толщины суммарного слоя стекла и биологического слоя. Изменение этой толщины в ходе реакции вычисляется по изменению фазы корреляционного сигнала с фотодиодов или ПЗС-камеры.

Достоинствами биосенсорной системы Пикоскоп® являются низкая стоимость проведения анализов, сравнимая со стоимостью анализа на основе иммунохроматографических тест-полосок, легкость мультиплексирования, т.е. проведения анализа на различные антигены/антитела в одном и том же образце, высокая чувствительность, быстрое и простое проведение измерений. Это обусловило успешное применение разработанных биосенсорных методов во многих прикладных научных исследованиях [8–12].

## 3. Иммуноанализ: схема

Схема разработанного иммуноанализа включает в себя следующие этапы.

1) Модификация поверхности сенсорных чипов. Для этого этапа был развит процесс модификации поверхности стекол для эффективной и быстрой иммобилизации нативных биомолекул с помощью эпоксилирования поверхности сенсорных чипов. Тщательно очищенные микроскопные покровные стекла в течение 16 часов инкубировались в вытяжном шкафу в 5% растворе ГОТС ((3-глицидоксипропил)триметоксисилан) в метаноле [13]. Затем стекла подвергались термообработке при температуре 120 °С в течение 60 минут в сушильном шкафу и промывались при комнатной температуре.

Контроль эффективности иммобилизации биомолекул на модифицированных чипах, а также последующие этапы самого анализа осуществлялись при установке чипов непосредственно в биосенсорном приборе Пикоскоп®. Для этого через кювету прибора вдоль поверхности чипа пропускались реагенты при объемной скорости потока 30 мкл/мин. Связывание биомолекул из растворов с поверхностью чипа регистрировалось прибором в режиме реального времени в виде сенсограмм — зависимостей изменения толщины биослоев от времени. Типичная сенсограмма приведена на рис. 1. Этап считался законченным, когда кривая сен-

сограммы выходила на насыщение. Тогда приступали к пропусканию следующего реагента. Между этапами для промывки пропускался фосфатно-солевой буфер.

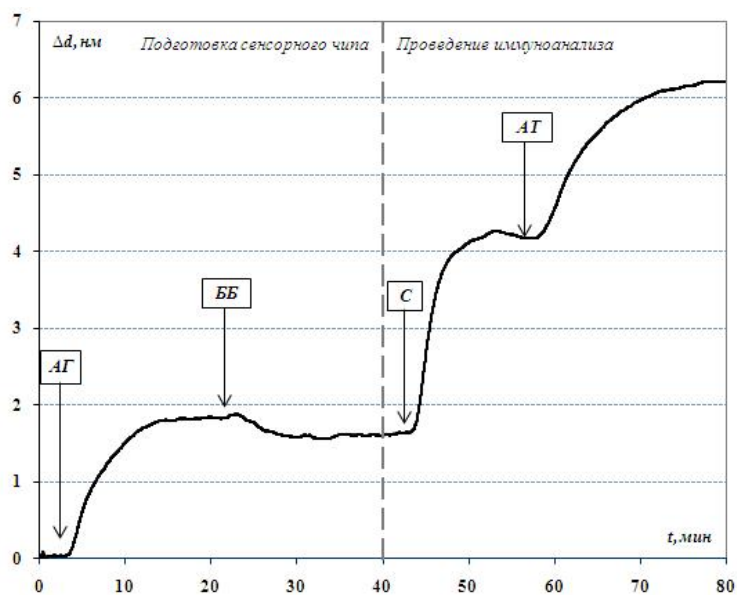


Рис. 1. Схема иммуноанализа, отслеживаемая в режиме реального времени в виде сенсограммы биосенсора. Стрелками указаны моменты начала пропускания вдоль поверхности сенсорного чипа растворов: АГ-антигена, ББ-блокирующего буфера, С-сыворотки, АГ-распознающих антител

2) Имобилизация антигена на поверхность сенсорного чипа. Раствор антигена в концентрации 50 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере пропускался вдоль поверхности сенсорного чипа. При этом за счет взаимодействия аминогрупп антигена и эпокси групп поверхности происходила ковалентная иммобилизация антигена на чипе.

3) Блокировка поверхности от неспецифического связывания. Несвязанные на предыдущем этапе эпокси группы на поверхности чипа блокировались с помощью блокирующего буфера — смеси из 1% раствора глицина и 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере. Отсутствие этого этапа приводило к значительному увеличению неспецифического связывания антител на последующих этапах.

Описанные выше этапы 1) – 3) предназначены для подготовки сенсорных чипов. Полученные после этапа 3) сенсорные чипы могут храниться, не теряя своих свойств, в течение длительного времени до начала проведения собственно анализа (этапы 4 и 5) .

4) Пропускание анализируемой сыворотки крови. Непосредственно перед экспериментом 3 мкл размороженной сыворотки крови разводились в 100 раз в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре и пропускались вдоль поверхности сенсорного чипа. На этом этапе детектировался существенный уровень неспецифического связывания компонентов сыворотки крови с сенсорным чипом. Указанный эффект не полностью устранялся описанной блокировкой поверхности и вносил фоновый вклад в получаемый сигнал. В связи с этим был введен следующий дополнительный этап № 5. Линейные зависимости сигнала от концентрации исследуемых антител в сыворотке на этапе № 5, представленные ниже, при наличии фонового сигнала на этапе № 4 могут означать, что неспецифический сигнал при пропускании сыворотки вызван компонентами сыворотки, отличными от исследуемых иммуноглобулинов.

5) Распознавание иммуноглобулинов на поверхности сенсорного чипа. Для устранения влияния на сигнал неспецифического связывания на данном этапе производилось пропускание вдоль поверхности сенсорного чипа раствора распознающих антител (2-е АТ) (козьих антител к иммуноглобулинам класса G человека) в концентрации 50 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. Эти антитела специфически связывались с комплексом «антитело – антиген», образовавшимся на поверхности сенсорного чипа на предыдущем этапе. Таким обра-

зом, регистрируемое на данном этапе изменение толщины биослоя обусловлено наличием детектируемых аутоантител и не зависит от непредсказуемого неспецифического связывания компонентов сыворотки с поверхностью сенсорного чипа.

#### 4. Иммуноанализ: детекция аутоантител

Для демонстрации разработанного иммуноанализа в качестве модельных агентов были выбраны антитела к тиреоглобулину (ТГ) и тиреопероксидазе (ТПО). Тиреоглобулин и тиреопероксидаза являются маркерами рака щитовидной железы и ряда аутоиммунных заболеваний, например гипертиреоза, тиреоидита и других. Определение указанных антител в клинической практике значительно расширяет возможности ранней диагностики, позволяет оценивать тяжесть аутоиммунных поражений, эффективность проводимого лечения и возможность развития клинических нарушений в динамике заболевания [14–17].

Образцы сыворотки крови и реагентов были получены из Белорусского государственного университета и клинической лаборатории (г. Москва) в замороженном виде ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Концентрации исследуемых аутоантител в сыворотках были предварительно измерены поставщиками методом ИФА и указаны в сопроводительных документах.

С помощью биосенсорной системы Пикоскоп<sup>®</sup> была исследована зависимость изменения толщины биослоя от концентрации антител на этапе № 5 иммуноанализа, т.е. этапе распознавания иммуноглобулинов на поверхности сенсорного чипа. Для определения такой зависимости для аутоантител на тиреоглобулин использовались сыворотки крови со значениями концентраций антител 160, 300 и 600 МЕ/мл, а также калибровочная проба 0 МЕ/мл. Полученная зависимость показана на рис. 2.

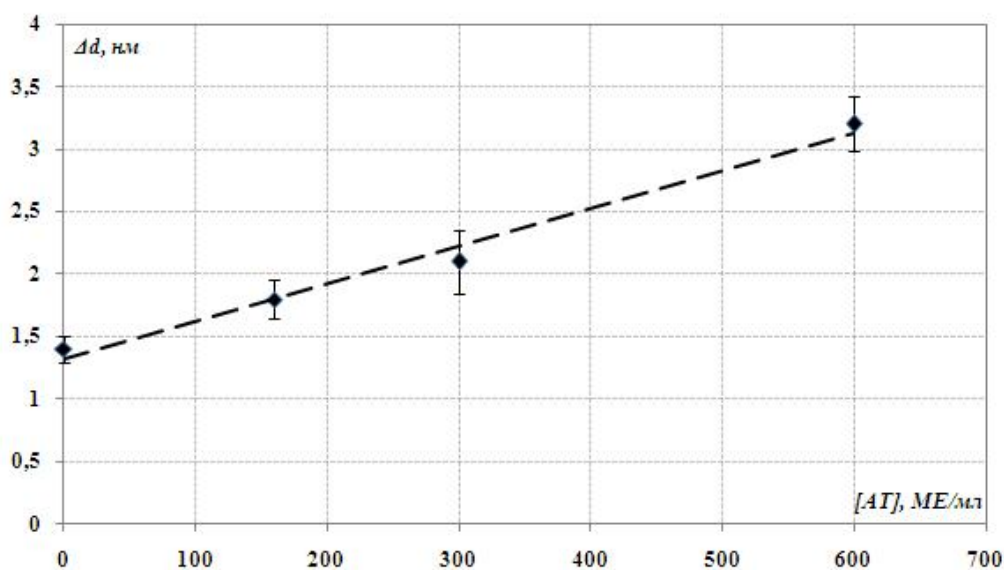


Рис. 2. Зависимость изменения толщины слоя от концентрации антител на тиреоглобулин на этапе пропускания распознающих антител

Аналогичная зависимость, полученная для антител на ТПО, представлена на рис. 3. На указанном графике представлены точки, полученные для сывороток из различных партий, одна из которых содержала сыворотки с концентрациями 120, 240 и 461 МЕ/мл, а вторая — 20 и 120 МЕ/мл. Зарегистрированные значения роста сигнала на этапе пропускания распознающих антител для обеих партий имеют линейную зависимость от концентрации с близкими коэффициентами наклона.

Данные калибровочные кривые позволяют по изменению сигнала биосенсорной системы определять концентрации антител на ТГ и ТПО в сыворотке.

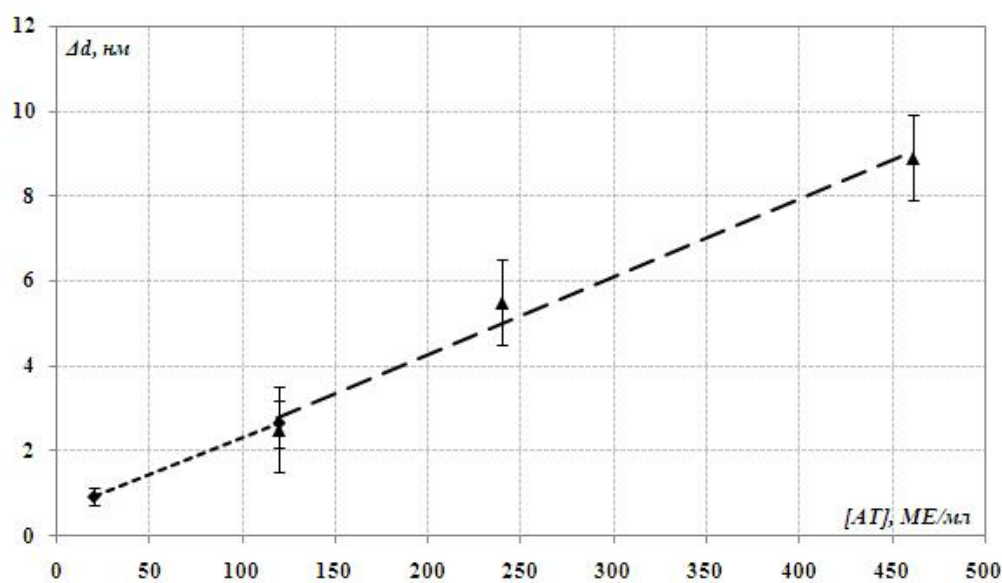


Рис. 3. Зависимость толщины слоя от концентрации антител на тиреопероксидазу на этапе пропуска распознающих антител

В качестве теста на «открытие» была проведена серия экспериментов для смеси сывороток крови. Из сывороток с содержанием антител на тиреопероксидазу в концентрациях 20 МЕ/мл и 120 МЕ/мл были приготовлены смеси со следующими результирующими концентрациями:

- 40 МЕ/мл при смешивании 20 МЕ/мл и 120 МЕ/мл в соотношении 4:1,
- 70 МЕ/мл при смешивании 20 МЕ/мл и 120 МЕ/мл в равных пропорциях,
- 100 МЕ/мл при смешивании 20 МЕ/мл и 120 МЕ/мл в соотношении 1:4.

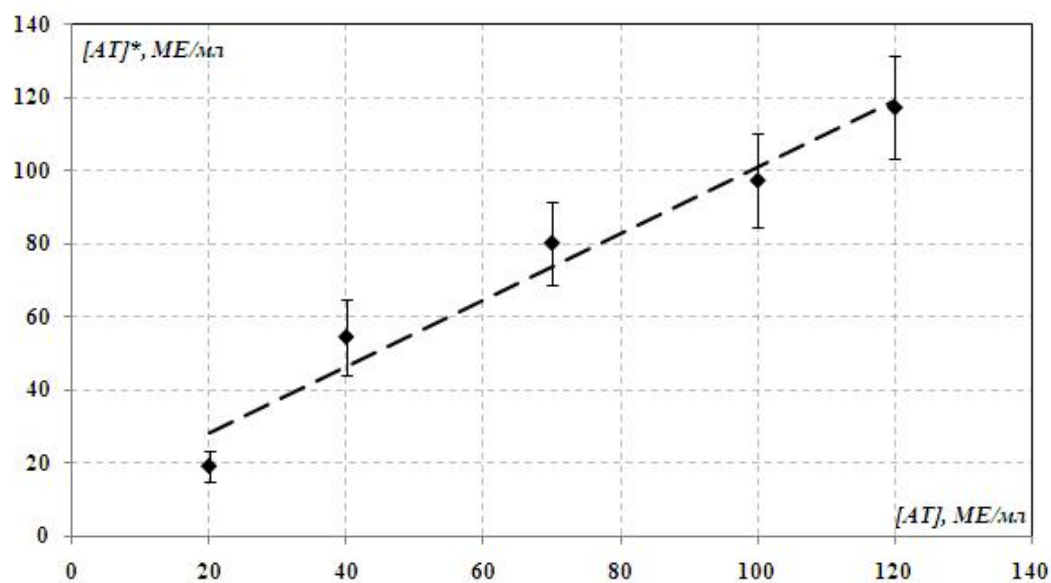


Рис. 4. Зависимость концентрации  $[AT]^*$ , определенной по калибровочной кривой, от концентрации  $[AT]$  антител на тиреопероксидазу для смеси сывороток

На рис. 4 представлена зависимость найденной по калибровочной кривой (рис. 3) концентрации от вводимой концентрации аутоантител. Данная зависимость близка к линейной, причем угол наклона близок к  $45^\circ$ . Процент «открытия» (отношение найденной концентрации к вводимой) составил от 95% до 136%. Таким образом, полученные данные свидетель-

ствуют о незначительном влиянии матрикса сыворотки на регистрируемый сигнал.

Пределы обнаружения антител в сыворотке крови определялись с использованием критерия  $3\sigma$  и составили 100 МЕ/мл для тиреоглобулина и 20 МЕ/мл для тиреопероксидазы в пересчете на неразбавленную сыворотку. Полученные значения являются клинически значимыми, поскольку уровень аутоантител к тиреоглобулину в сыворотке в норме составляет до 100 МЕ/мл, а аутоантител к тиреопероксидазе — до 30 МЕ/мл [18].

Пределы обнаружения разработанного иммуноанализа не уступают пределам детекции традиционно используемых методов. Однако важными преимуществами предлагаемого метода являются малое время его проведения: 30–40 минут по сравнению с 3 часами традиционно используемого ИФА, возможность наблюдения всех этапов анализа в реальном времени, недорогие и широкодоступные расходные материалы.

Более того, предлагаемый метод допускает дальнейшее улучшение чувствительности за счет амплификации сигнала с помощью использования на заключительном этапе наночастиц. Такой подход был описан ранее для увеличения чувствительности иммуноанализа и приводил к улучшению предела обнаружения на три порядка [19]. В частности, перспективным для увеличения размеров комплексов, связавшихся на сенсорной поверхности, является использование магнитных наночастиц, управляемых внешними магнитными полями.

## 5. Выводы

В данной работе с помощью биосенсорной системы Пикоскоп<sup>®</sup> был разработан быстрый безметочный метод иммуноанализа. Оптимизированы методы иммобилизации биомолекул на поверхности сенсорных чипов, в качестве которых используются дешевые и широкодоступные микроскопные покровные стекла. Продемонстрирована детекция аутоантител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе в сыворотке крови. Получены калибровочные зависимости сигнала от концентрации. Достигнуты клинически значимые пределы обнаружения антител в сыворотке крови — 100 МЕ/мл для антител на ТГ и 20 МЕ/мл для антител на ТПО. Возможно дальнейшее повышение уровня чувствительности с помощью разработанных ранее методов амплификации сигнала, в частности, с помощью магнитных наночастиц. Предложенный безметочный метод при одинаковой чувствительности по сравнению с конкурирующими методами характеризуется меньшим временем анализа, позволяет использовать более дешевые расходные материалы, хорошо совместим с микромассивами различных рецепторов на сенсорной поверхности и мультиплексированием. Метод представляется перспективным для клинических применений, для экологического мониторинга, для обнаружения патогенов и опасных химических веществ в продуктах питания, контроля биотехнологических процессов и фармацевтических препаратов.

## 6. Благодарности

Авторы благодарят Дарашкевича О.Н. (Белорусский государственный университет, г. Минск) за предоставленные сыворотки и иммунореагенты.

Работа выполнена при частичной поддержке ГК № 16.512.11.2124 и № 14.740.11.1179, а также грантов РФФИ.

## Литература

1. *Тертон М., Бангхем Д. Р., Колкотт К. А. [и др.]*. Новые методы иммуноанализа. — М.: Мир, 1991.
2. *Segars F. M., Kinkade J. M.* Solid phase radioimmunoassay using labeled antibodies: a conceptual framework for designing assays // *Journal of Immunological Methods*. — 1997. — V. 14. — P. 73–84.

3. The Immunoassay Handbook / ed. by David Wild. — Amsterdam, Boston, Oxford: Elsevier Science Publishing Company, 2005.
4. *Kress-Rogers E.* Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and the environment. — CRC Press, 1997.
5. Handbook of Surface Plasmon Resonance / ed. by Schasfoort R.B.M., Tudos A.J. — RSC publishing, 2008.
6. *Wood W.G.* «Matrix Effects» in Immunoassays // Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. — 1991. — V. 51. — P. 105–112.
7. *Cash K. J., Ricci F., Kevin W. P.* An Electrochemical Sensor for the Detection of Protein-Small Molecule Interactions Directly in Serum and Other Complex Matrices // JACS. — 2009. — V. 131. — P. 6955–6957.
8. *Никитин П. И., Горшков Б. Г., Валейко М. В., Рогов С. И.* Спектрально-фазовый интерференционный метод регистрации биохимических реакций на поверхности // Квантовая электроника. — 2000. — Т. 30. — С. 1099–1104.
9. *Nikitin P. I.* Picoscopes, New Label-Free Biosensors, in Handbook of Biosensors and Biochips / ed. R. Marks, D. Cullen, I. Karube, C. Lowe, H.H. Weetall, John Wiley&Sons, // Ltd. ISBN 978-0-470-01905-4, 2007.
10. *Nikitin P. I., Gorshkov B. G., Nikitin E. P., Ksenevich T. I.* Picoscope, a new label-free biosensor // Sensors and Actuators B. — 2005. — V. 111–112. — P. 500–504.
11. *Nikitin P. I., Valeiko M. V., Gorshkov B. G.* New Direct Optical Biosensors for Multi-Analyte Detection // Sensors and Actuators B. — 2003. — V. 90 — P. 46–51.
12. *Nikitin P. I., Gorshkov B. G., Valeiko M. V., Nikitin S. I.* Multichannel optical biosensors for label free high-throughput screening // SPIE Proceedings. — 2001. — 4578. — P. 126–135.
13. *Hermanson G. T.* Bioconjugate Technique. — Academic Press, Inc. — 2008.
14. *Akamizu T.* Monoclonal antibodies to thyroid specific autoantigens // Autoimmunity. — 2003. — V. 36(6–7). — P. 361–366.
15. *Sinclair D.* Clinical and laboratory aspects of thyroid autoantibodies // Ann. Clin. Biochem. — 2006. — V. 43. — P. 173–183.
16. *Trbojevic B., Djurica S.* Diagnosis of autoimmune thyroid disease // Srp. Arh. Celok Lek. — 2005. — V. 133, N 1. — P. 25–33.
17. *Gartner R.* Modern diagnostic approach to autoimmune thyroiditis // MMW Fortschr. Med. — 2006. — V. 148, N 16. — P. 43–45.
18. *Подзолкова Н. М., Глазкова О. Л., Сибирская Е. В.* Иммунологические факторы в патогенезе нарушения менструального цикла у женщин, больных сахарным диабетом I типа // Проблемы репродукции. — 2006. — № 5.
19. *Diryugina E. G., Ksenevich T. I., Nikitin P. I.* Investigation of signal amplification of direct optical biosensor Picoscope for quantitative immunoassay // Book of Abstracts of the III International Competition for Scientific Papers in Nanotechnology for Young Researchers, RusNanoForum, Moscow. — 2010.

Поступила в редакцию 06.06.2012.