

БІОСЕНСОРИ BIOSENSORS

УДК 577.112.3:612.39

РОЗРОБКА АВТОНОМНОЇ БАГАТОКАНАЛЬНОЇ ІМУНОСЕНСОРНОЇ КАМЕРИ ДЛЯ ПЛАЗМОН-ПОЛЯРИТОННИХ СПЕКТРОМЕТРІВ СЕРІЇ «ПЛАЗМОН»

*В. Назаренко¹, Н. Сторожилова¹, Є. Макогоненко¹, Г. Березницький¹, І. Колеснікова¹,
Е. Луговской¹, А. Самойлов², Ю. Ушенін²*

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича 9, Київ, 01601, Україна, тел.: [38-044] 2341106; факс: [38-044] 2796365, e-mail:nazarenko@biochem.kiev.ua;

²Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ, Україна

РОЗРОБКА АВТОНОМНОЇ БАГАТОКАНАЛЬНОЇ ІМУНОСЕНСОРНОЇ КАМЕРИ ДЛЯ ПЛАЗМОН-ПОЛЯРИТОННИХ СПЕКТРОМЕТРІВ СЕРІЇ «ПЛАЗМОН»

*В. Назаренко, Н. Сторожилова, Є. Макогоненко, Г. Березницький, І. Колеснікова,
Е. Луговской, А. Самойлов, Ю. Ушенін*

Анотація. Розроблено, виготовлено і протестовано діючий макет автономної багатоканальної імуносенсорної камери, призначеної для роботи з приладами серії «Плазмон», яка придатна для багаторазового використання та тривалого зберігання імуносенсорного чіпа.

Ключові слова: багатоканальна імуносенсорна камера, оптимізація, ППР, «Плазмон», одночасна ковалентна іммобілізація, монАТ, фібриноген

DEVELOPMENT OF THE AUTONOMOUS MULTICHANNEL IMMUNOSENSOR CHAMBER FOR PLASMON-POLARITON OF «PLASMON» SPECTROMETER SERIES

*V. Nazarenko, N. Storozhylova, Ye. Makogonenko, G. Bereznitsky, I. Kolesnikova, E. Lugovskoi,
A. Samoilov, Yu. Ushenin*

Abstract. Developed, manufactured and tested operating item mock-up of autonomous multichannel immunosensor chamber intended to be used with the «Plasmon» series devices appropriate for re-usable and long-term storage of immunosensor chip.

Keywords: multichannel immunosensor chamber, optimization, SPR, «Plasmon», simultaneous covalent immobilization, monAB, fibrinogen

РАЗРАБОТКА АВТОНОМНОЙ МНОГОКАНАЛЬНОЙ ИММУНОСЕНСОРНОЙ КАМЕРЫ ДЛЯ ПЛАЗМОН-ПОЛЯРИТОННЫХ СПЕКТРОМЕТРОВ СЕРИИ «ПЛАЗМОН»

В. Назаренко, Н. Сторожилова, Е. Макогоненко, Г. Березницький, И. Колесникова, Э. Луговской, А. Самойлов, Ю. Ушенин

Аннотация. Разработан, изготовлен и протестирован действующий макет автономной многоканальной иммуносенсорной камеры, предназначенной для работы с приборами серии «Плазмон», пригодной для многоразового использования и длительного хранения иммуносенсорного чипа.

Ключевые слова: многоканальная иммуносенсорная камера, оптимизация, ППР, «Плазмон», одновременная ковалентная иммобилизация, монАТ, фибриноген

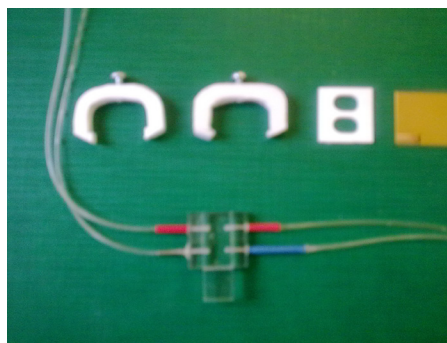
Аналітичні прилади на основі поверхневого плазмонного резонансу серії «Плазмон» широко застосовуються в біологічних дослідженнях для визначення різних нормальних, патологічних і токсичних компонентів біологічних об'єктів та навколишнього середовища [1]. Проте вони мають недоліки технологічного характеру, перш за все недосконалу комірку для роботи з білковими об'єктами, що створює незручності в роботі з білковими лігандами. Основний недолік приладу – це стандартна камера для сенсорного чіпа, що створює труднощі при виготовленні біосенсорного чіпа та унеможливує повторне використання сенсорного чіпа з іммобілізованими білковими лігандами після видалення його з приладу.

Метою роботи було удосконалення конструкції автономної багатоканальної імуносенсорної камери (БІК) для визначення білків у біологічних рідинах та тестування її роботи на модельних системах з чистих білків плазми крові із застосуванням приладів серії «Плазмон».

Автономна імуносенсорна камера є моноблочною конструкцією, що складається безпосередньо з пластикової кювети, ущільнювача із силіконової гуми та скляної пластинки з нанесеним плазмон-підтримуючим шаром золота, рис. 1, А і Б.

Розроблену модель камери було оптимізовано наступним чином. Оскільки, з одного боку, камера повинна забезпечувати повну герметичність комірок, що необхідно для надання можливості їй багаторазового використання, а з другого – можливість достатньо

легкого вилучення з камери скляної сенсорної пластини та її заміну на нову, то було проведено моделювання чотирьох варіантів конструкції камери:



А



Б

Рис. 1. Діючий макет автономної багаторазової двоканальної камери з імуносенсорним біочіпом в розібраному (А) і зібраному (Б) вигляді.

а) конструкція, де герметичність та склеювання пластикової кювети із скляною пластинною забезпечував силіконовий герметик,

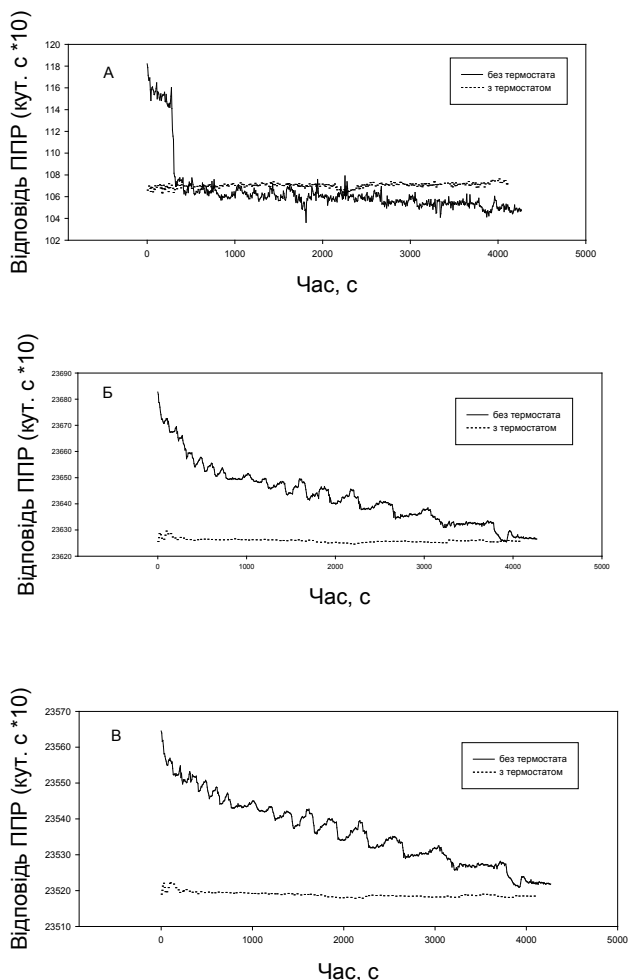


Рис. 2. Сенсограми приладу в ході його стабілізації у відсутності та за умов термостатування в термостатуючому блоці.

А – різниця сигналу між робочою і контрольною комірками;

Б – зміна величини сигналу в контрольній комірці;

В – зміна величини сигналу в робочій комірці.

нанесений відповідним чином для створення необхідного об'єму комірок; б) конструкція, де використовувався стандартний гумовий ущільнювач, який закріплено разом із пластикою кюветою та зі скляною пластиною за допомогою тонкої клейкої стрічки; в) камери, де пластикова кювета скріплена зі скляною пластиною за допомогою достатньо товстої (приблизно 1 мм) двошарової клейкої стрічки; г) камери, де герметичність комірок забезпечувала спеціальна конструкція типу струбцини. Дослідження з герметичності, біологічної

та хімічної інертності, зручності збірки і використання показали, що варіант (г) є найбільш оптимальним і дозволили виготовити на його основі діючий макет автономної багатоканальної імуносенсорної камери, представленої на рис. 1.



Рис. 3. ППР прилад «Плазмон б» з закріпленою двоканальною багаторазовою імуносенсорною камерою, який знаходиться в термостатуючому блоці.

Одним із важливих факторів, який впливає на величину коефіцієнта заломлення середовища поблизу поверхні сенсора і стабільність резонансного сигналу ППР спектрометра серії «Плазмон-6» є температура навколишнього середовища, в якому працює прилад. На рис. 2 наведено сенсограми приладу в умовах стабілізації протягом 1 години 10 хв в кімнаті без термостату (криві показано жирною лінією) і в умовах стабілізації температури при 25 °С за допомогою повітряного термостату (криві показано штрих-пунктирною лінією).

Наведені результати свідчать про високу ефективність застосування термостатування приладу, оскільки скорочується час стабілізації приладу і зменшується розкид даних сенсограми. З цією метою ми запропонували використовувати камеру з повітряним термостатом, макет якої представлено на рис. 3.

Одночасну ковалентну іммобілізацію (ОКІ) анти-фібрин(оген)ових монАТ у робочих комірках камери здійснювали за допомогою повністю зібраних камер з попередньо активними карбоксильними групами на функ-

ціональній поверхні біосенсорного чіпу. На відміну від попереднього способу іммобілізації монАТ на золотій поверхні пластинки [2], у випадку ОКІ вводили монАТ з концентрацією 25 - 50 мкг/мл в буфері 0,02 М HEPES, pH 7,4, 0,3 М NaCl, 0,005 % Tween-20, 0,005% NaN₃ безпосередньо і одночасно в комірки приладу для ППР («Плазмон б») для спостереження процесу їх ковалентного зв'язування в реальному часі. На рис. 4 наведено типові криві зростання ППР сигналу, що показує рівень зростання кількості ковалентно іммобілізованого білка монАТ на активованій поверхні імуносенсорного чіпа (золотої пластинки).

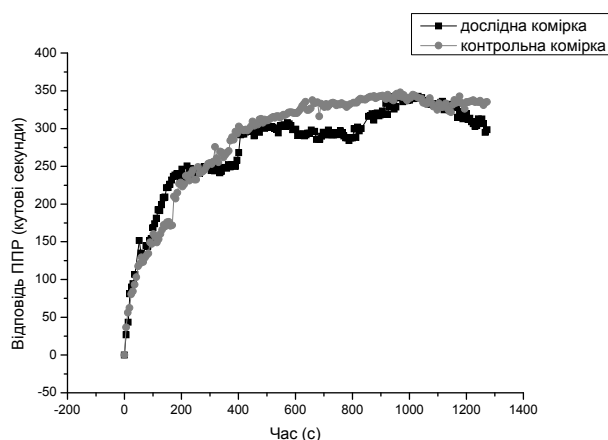


Рис. 4. Сенсограми реєстрації ковалентного зв'язування мон АТ II-4d з активованою поверхнею імуносенсорного чіпа в реальному часі в контрольній і робочій комірці автономної камери одночасно.

Рівень зв'язування в обох комірках, одну з яких умовно визначали як контроль, однаковий і складає приблизно 350 кутових секунд на мм². Беручи до уваги той факт, що зсув мінімуму резонансного кута в 1000 с відповідає зв'язуванню 1 нг на мм², то кількість іммобілізованих антитіл складає 0,35 нг або 350 пг/мм², що відповідає щільності монАТ 1 пмоль на мм² або $\sim 10^{11}$ молекул монАТ.

Комірки біосенсорного чіпу тричі промили 0,02 М HEPES, pH 7,4, буфером, що містив 0,3 М NaCl, 0,005 % Tween-20, 0,005% NaN₃. Підготовлений таким чином біосенсорний чіп використали для перевірки зв'язування фібриногену (Fg), des АВ фібрину, DD димеру в модельних системах з очищених білків. Регене-

рацію чіпа проводили шляхом послідовного промивання робочої та контрольної комірки розчином 50 % етиленгліколю, 2 М сечовини та багаторазовим промиванням комірок робочим буфером 0,02 М HEPES, pH 7,4, 0,3 М NaCl, 0,005 % Tween-20, 0,005% NaN₃.

Із застосуванням БІК були також проведені дослідження процесу полімеризації фібрину, а саме: механізму експозиції неоантігенної детермінанти в 121-134 ділянці В β -ланцюга фібрину [3]; локалізації α C домену в фібриногені і фібрині [4]; локалізації епітопу фібринспецифічного монАТ I-3с; визначення констант дисоціації реакцій зв'язування фібрин(оген)у з монАТ, пептиду В β 121-138 з монАТ I-3с, та інші. Рис. 5 і 6 ілюструють приклади дослідів, виконаних із застосуванням БІК. На рис. 5 наведено сенсограми, які показують діапазон чутливості імуносенсорного чіпа, ілюструють кінетику зв'язування та дають можливість визначення кількості білку у плазмі крові, оскільки за висотою підйому кривої можна визначити вміст зв'язаного білку. Досліди проводили з модельними розчинами фібриногену. За результатами отриманих сенсограм було побудовано калібрувальну криву.

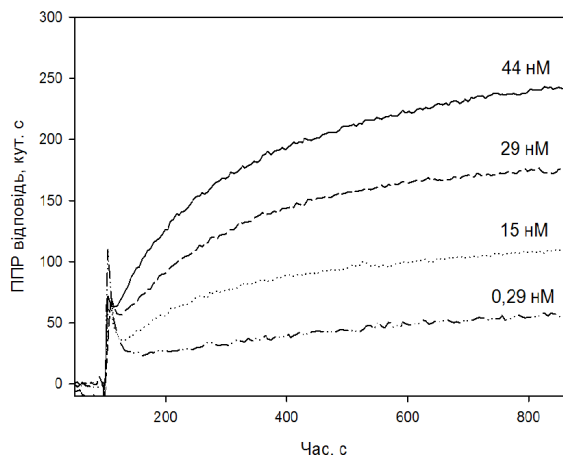


Рис. 5. Серія сенсограм зв'язування фібриногену з монАТ II-4d для побудови калібрувальної кривої.

Компактна структура фібриногену в плазмі крові підтримується завдяки взаємодії α C доменів з FpA, FpB і між собою. За активації фібриногену тромбіном відщеплюється FpA і FpB і відбувається дисоціації α C-доменів від E регіону остова молекули фібриногену та пере-

ключенню їх з внутрішньо- на міжмолекулярну взаємодію, що прискорює латеральну асоціацію протофібрил. Вважають, що дисоціація α C доменів збігається з початком відщеплення FpB. Для перевірки цього припущення в роботу і контрольну комірку одночасно додали Fg + анцистрон H, і Fg, відповідно (рис. 6), і реєстрували збільшення різниці сигналів між ними, що є наслідком зв'язування з монАТ I-3с олігомерів дезА-фібрину, які утворюються *in situ*.

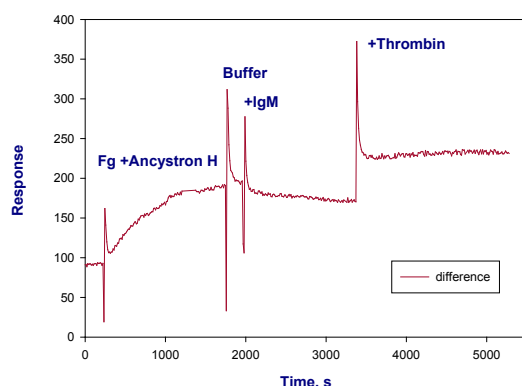


Рис. 6. ППР аналіз дисоціації α C-регіону молекули Fg від її остова в процесі послідовної трансформації Fg в desA- і desAB-фібрин. Сенсограма зв'язування анти- α C-домен монАТ IgM з дезА і дезAB фібрином, що вказує на недоступність в дезА- і доступність в дезAB-фібрині епітопу для монАТ IgM.

Після відмивання комірок буфером, в них внесли анти- α C монАТ. Збільшення сигналу не спостерігали, а, навпаки, мала місце незначна дисоціація олігомерів дезА-фібрину з монАТ I-3с. З додаванням тромбіну і анти- α C-домен монАТ сигнал почав збільшуватися, що вказувало на появу епітопів для анти- α C-домен монАТ, тобто на дисоціацію α C доменів.

Наведені дані експериментів свідчать про те, що розроблена модель автономної багато-канальної імуносенсорної камери для багаторазового використання дозволяє більш зручно, ефективно та надійно проводити дослідження на ППР-приладі серії «Плазмон».

Список літератури:

1. *Войтович І. Д., Корсунський В. М.* Інтелектуальні сенсори. 2007. – Київ. – 513 с.
2. *Storozhylova N. S., Bereznytsky G. K., Makogonenko E. M., Lugovskoi E. V.* Preparation of SPR Immunosensor Chip for Fibrinogen and Soluble Fibrin Determination in Human Plasma// Materials of The Bridges in Life Sciences 6th Annual Scientific Meeting [«RECOOP HST Consortium»], (Bratislava, Slovakia, April 8-10, 2011) / - p. 146-147.
3. *Урвант Л. П., Макогоненко Є. М., Березніцкі Г. К., Луговська Н. Е., Луговський Е. В., Колеснікова І. М., Підюра М. О., Позняк Т. А., Сторожилова Н. С., Комісаренко С. В.* Відщеплення фібринопептиду А викликає структурні перебудови в 118-134 ділянці молекули фібрин(оген)у// ДАН України.- 2012.- N7.- с. 170-175.
4. *Позняк Т. А., Колесніова І. М., Макогоненко Є. М., Литвинова Л. М., Костюченко О. П., Гоголінська Г. К., Підюра О. М., Луговський Е. В., Комісаренко С. В.* Зміни просторової орієнтації α C регіонів в молекулі фібриногену під час його трансформації у полімерний фібрин// Доп. НАН України.- 2012. – N5. – С. 168-173.