

УДК 57.083.3; 577.112; 615.07

ЛАТЕРАЛЬНЫЙ ПРОТОЧНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ТРОПОНИНА-I

Е.А. Яковлева, И.П. Андреева, В.Г. Григоренко, А.М. Егоров, А.П. Осипов

(кафедра химической энзимологии; e-mail: yakovlevahelena@gmail.com)

Разработан метод иммунохроматографического анализа для экспресс-определения тропонина-I. В качестве визуальной метки использованы наночастицы золота. Определены оптимальные условия проведения анализа. Предел обнаружения метода составил 1 нг/мл, коэффициент вариации не превышал 10%.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ; острый инфаркт миокарда; тропонин-I.

Актуальность проблемы ранней и точной диагностики острой ишемической болезни, включая и острый инфаркт миокарда (ОИМ), очевидна для каждого врача. До недавнего времени ни один из известных методов не гарантировал надежной диагностики ОИМ, особенно на ранней стадии болезни. Многочисленными исследованиями установлено, что раннее начало терапии при подтвержденном диагнозе ОИМ позволяет уменьшить летальность как в первые часы, так и в более поздние сроки пребывания больного в стационаре. Поэтому своевременная диагностика ОИМ является одной из актуальных проблем современной кардиологии.

Развитие ОИМ сопровождается обширным разрушением кардиомиоцитов и, следовательно, большим выбросом в кровь специфичных для миокарда белков. Тропонин является признанным маркером ОИМ. Тропонины (I, T и C) в соотношении 1:1:1 входят в состав тропонинового комплекса, который связан с тропомиозином, образующим вместе с актином тонкие филаменты миоцитов – важнейший компонент контрактильного аппарата клеток поперечно-полосатой мускулатуры. Тропонин-I (ТnI) существует в трех уникальных по структуре изоформах для каждого типа поперечно-полосатых мышц (быстрых, медленных и сердечных) [1–3]. Кардиальная изоформа ТnI существенно отличается от других изоформ ТnI, локализующихся в скелетной мускулатуре, поскольку содержит дополнительный N-концевой полипептид, состоящий из тридцати одного аминокислотного остатка [4]. Таким образом, ТnI можно считать абсолютно специфичным кардиомаркером. В крови здоровых людей концентрация ТnI очень низкая. При инфаркте миокарда тропонин обнаруживается в крови

через 4–6 ч, пик его концентрации приходится на 1–2 сутки и остается повышенным до 6–8 дней. Степень увеличения концентрации ТnI в этот период весьма значительна, хотя несколько различается у отдельных категорий пациентов. ТnI относится к поздним диагностическим маркерам, позволяющим как подтверждать ранее установленный диагноз, так и выявлять «пропущенные» формы ОИМ [5].

В последние годы в медицинской практике для быстрого выявления биологически активных соединений и диагностики многих заболеваний нашли широкое применение методы визуального иммунохроматографического анализа (ИХА), которые характеризуются коротким временем анализа (10–15 мин), простой и доступной процедурой определения, не требующей дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала.

Цель настоящей работы состояла в разработке иммунохроматографической тест-системы для определения тропонина I.

Экспериментальная часть

В работе использованы золотохлористоводородная кислота (ЗХВК) («Fluka», Швейцария); бычий сывороточный альбумин (БСА), цитрат натрия, индикаторные pH-полоски, биохимические и химические реагенты фирмы «Sigma» (США); неорганические соли марки «ос.ч.» («Химмед», Россия), моноклональные антитела к ТnI пяти видов (МАт-1, МАт-2, МАт-3, МАт-4, МАт-5), а также тропонин-I фирмы «Биалекса». Антивидовые антитела овцы против IgG мыши были предоставлены ЗАО «НВО Иммунотех». В мульти-мембранных тест-полосках для иммунохроматографии были использованы мембраны фирмы MDI (Индия).

Использовали следующие буферные растворы: 0,01 М К-фосфатный, рН 7,0 (ФБ); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, рН 7,2-7,4 (ФБС); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,1% твин 20, рН 7,4 (ФБСТ).

Стандартные растворы ТнI для анализа с концентрациями 0; 0,048; 0,24; 1,2; 6; 30 нг/мл готовили в ФБСТ или сыворотке крови, не содержащей ТнI, из исходного раствора ТнI (10000 нг/мл в ФБС).

Получение коллоидного золота

Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали по методу Френса [6]. В колбу с магнитной мешалкой добавляли 99 мл бидистиллированной воды и 1 мл 1%-го раствора ЗХВК. Раствор нагревали до кипения, после чего быстро при перемешивании добавляли 1,6 мл 1%-го водного раствора цитрата натрия. Раствор кипятили еще 15 мин при перемешивании, затем охлаждали до комнатной температуры в темном месте. Средний размер полученных наночастиц, по данным сканирующей электронной микроскопии, составил 35 нм.

Определение оптимальных условий сорбции антител на наночастицах золота

Оптимизацию проводили на 96-луночном полистироловом планшете («Greiner», Австрия). На планшете выбирали 8 рядов, в каждом из которых было по 6 лунок. Каждый ряд соответствовал фиксированному значению рН, а каждый столбец – определенной концентрации антител.

В аликвотах (по 2,5 мл) суспензии коллоидного золота доводили рН до значений в диапазоне от 5,5 до 9,0 с шагом 0,5, добавляя 0,1 М раствора карбоната натрия. В лунки планшета вносили по 200 мкл растворов коллоидного золота с соответствующими значениями рН и по 20 мкл растворов антител с концентрациями 0, 30, 60, 120, 180, 360 мкг/мл в деионизованной воде. Планшет инкубировали 15 мин при перемешивании и добавляли по 50 мкл 10%-го раствора хлорида натрия. Измеряли оптическое поглощение в лунках планшета на длинах волн 520 и 580 нм.

Приготовление конъюгата наночастиц золота с антителами

К 10 мл раствора коллоидного золота с рН 7,0–7,5 добавляли по каплям при перемешивании 1 мл раствора антител с выбранной концентрацией, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем к полученному раствору добавляли БСА

до конечной концентрации 0,1%, сахарозу до конечной концентрации 10%, а также 0,01% азида натрия. Смесь хранили при температуре +4°C.

Для удаления несвязавшихся антител конъюгат центрифугировали (20 мин, 11000g, 4°C). Супернатант удаляли, осадок перерастворяли в требуемом объеме ФБ, содержащем 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия. Измеряли спектр поглощения и полученный раствор наносили на полосу стекловолоконной мембраны 4×4 мм из расчета 10 мкл на полосу с $A_{520} = 2$ опт. ед.

Получение иммунохроматографического композита

На аналитическую нитроцеллюлозную мембрану наносили раствор специфических антител в ФБС с помощью программируемого автоматического диспенсера «BioDot XYZ 3050» («BioJet Quanti 3000», «BioDot», США) для формирования аналитической зоны. Для формирования контрольной зоны иммунохроматографической системы на расстоянии 5 мм от аналитической зоны наносили раствор аффинно очищенных антивидовых антител овцы против мыши с концентрацией 1 мг/мл. Использовали следующие параметры насоса «BioJet Quanti 3000» для нанесения образцов: размер капли 30 нл, шаг 0,3 мм, скорость 50 мм/с. Полоски высушивали при температуре 37°C (относительная влажность 25–30%) в течение 24 ч и хранили при комнатной температуре в герметично закрытой упаковке.

Растворы конъюгатов антител с наночастицами коллоидного золота наносили на мембраны РТ-5 и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Собирали тест-полоски в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.

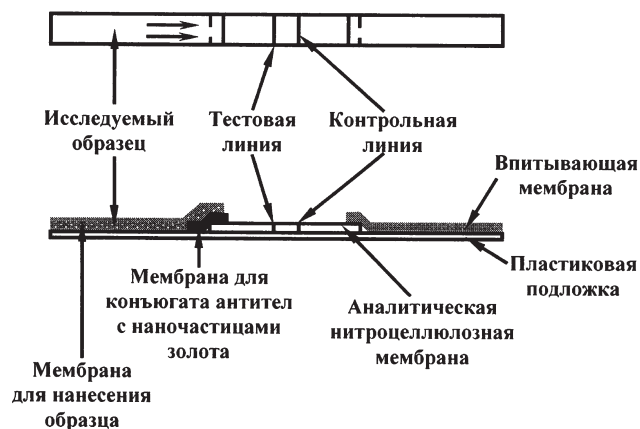


Рис. 1. Схема тест-полоски

Проведение иммунохроматографического анализа

Готовые тест-полоски вертикально помещали в лунку полистиролового планшета для ИФА либо со 180 мкл стандартных растворов ТнI в ФБСТ, либо со 180 мкл растворов сывороток крови, не содержащих ТнI, предварительно разбавленных в 5 раз ФБСТ. Через 15 мин тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность и высушивали.

Для количественной оценки результатов анализа тест-полоски сканировали на планшетном сканере «Epson Perfection V700 Photo» («Seiko-Epson», Япония), полученные в виде графических файлов (tif) изображения обрабатывали с помощью программы Scion Image, определяли интенсивность окраски полос в аналитической зоне (в виде условных единиц) и строили градуировочные графики зависимости интенсивности полос от концентраций стандартных растворов ТнI.

Предел обнаружения метода (нг/мл) рассчитывали как концентрацию ТнI, соответствующую 2 условным единицам интенсивности сигнала.

Результаты и обсуждение

Имунохроматографический анализ основан на взаимодействии определяемого антигена (ТнI) с антителами, в качестве визуального детектирующего агента используются наночастицы золота, обладающие способностью поглощать свет в видимой области спектра. Тест-полоска для проведения ИХА представляет собой подложку с последовательно наклеенными мембранами (рис. 1), вдоль которых движется поток жидкости, содержащий анализируемый образец.

При нанесении образца на специальную мембрану начинается его движение вдоль полоски под действием капиллярных сил. В присутствии определяемого антигена в образце происходит образование комплекса антигена с мечеными наночастицами золота специфическими антителами, сорбированными на стекловолоконной мембране. Далее в тестовой зоне происходит связывание образовавшегося иммунокомплекса иммобилизованными в виде узкой линии специфическими антителами и наблюдается появление окрашенной полосы, интенсивность которой пропорциональна содержанию анализируемого вещества в образце. Избыток несвязавшихся меченых антител мигрирует далее к контрольной зоне, где иммобилизованы антивидовые антитела, при этом образуется вторая окрашенная линия. При отсутствии в исследу-

емом образце ТнI меченные золотом антитела задерживаются лишь вторичными антителами в контрольной зоне. Таким образом, наличие видимой окраски в контрольной зоне в обоих случаях свидетельствует о пригодности теста для анализа.

В настоящей работе были исследованы пять видов моноклональных антител, специфичных к ТнI. В первую очередь необходимо было подобрать оптимальные условия (минимальная стабилизирующая концентрация и pH сорбции) для получения стабильных меченных наночастицами золота антител, способных эффективно взаимодействовать с ТнI. Для выбора оптимальных значений pH и концентрации антител проводили перекрестное титрование. Для этого готовили серию растворов коллоидного золота с разными значениями pH (от 5,5 до 9,0) с шагом 0,5, к которым добавляли специфические антитела с разной концентрацией (от 0 до 30 мкг/мл). При увеличении ионной силы добавлением хлорида натрия происходила агрегация нестабилизированных наночастиц золота, что сопровождалось изменением цвета раствора с красного до серо-синего, вплоть до бесцветного. Для стабилизированных наночастиц золота характерный пик плазмонного резонанса находится в районе 520 нм. Поэтому для определения количественного эффекта стабилизации вычисляли разность оптических поглощений раствора при длинах волн 520 и 580 нм ($A_{520} - A_{580}$).

На рис. 2 представлены полученные данные для моноклональных антител МАт-2, специфичных к тропонину. Для остальных антител были получены аналогичные результаты. Следует отметить, что с увеличением концентрации антител влияние pH (начиная с 7,5) на стабилизацию уменьшается. Для получения

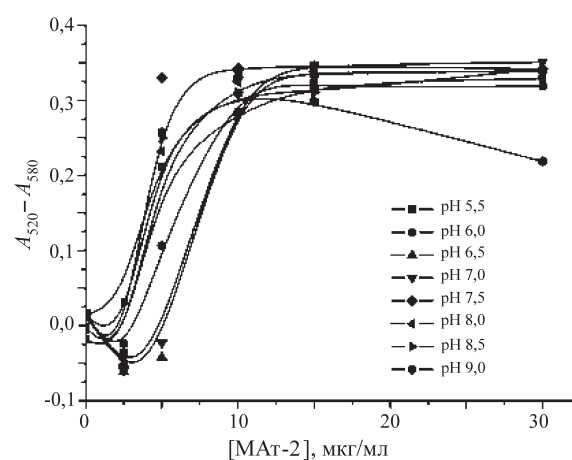


Рис. 2. Зависимость разности оптического поглощения от концентрации МАт-2 для разных значений pH

меченых антител в качестве оптимального было выбрано значение рН раствора в диапазоне 7,0–7,5 для всех видов антител.

В изученном диапазоне нагрузки золя по антителам в пределах 0–30 мкг/мл минимальная насыщающая концентрация антител, обеспечивающая наибольшую устойчивость золя к коагулирующему действию электролита, определяется выходом кривой на плато, и для всех видов антител она составила 15 мкг на 1 мл золя. Данные концентрации были использованы при получении конъюгатов антител с наночастицами золота.

На следующем этапе была выбрана пара антител, иммобилизованных на фазе и меченных наночастицами золота, обеспечивающих максимальную чувствительность анализа ТнI. Были изучены все возможные комбинации, когда на фазе нанесен один вид антител, а конъюгат приготовлен с другими антителами. Для каждой пары антител был проведен ИХА для стандартных растворов ТнI в ФБСТ (рис. 3). Наилучший предел обнаружения и самый высокий сигнал был получен для пары моноклональных антител МАТ-3, иммобилизованных на мембране, и МАТ-2, конъюгированных с наночастицами золота (рис. 4, кривая 1).

Также было проведено сравнение конъюгатов антител, полученных с частицами золота разного размера (20 и 35 нм). При использовании наночастиц золота большего диаметра (порядка 35 нм) наблюдалось значительное увеличение интенсивности сигнала и как следствие чувствительности анализа. Это, возможно, связано с тем, что человеческий глаз лучше воспринимает более контрастный пурпурный цвет, характерный для большого размера частиц золота. Кроме того, согласно литературным данным, на частицы золота с увеличением их диаметра сорбируется большее количество молекул IgG, что также может приводить к увеличению интенсивности окраски. Таким образом, в дальнейших экспериментах использовался раствор коллоидного золота с диаметром частиц 35 нм.

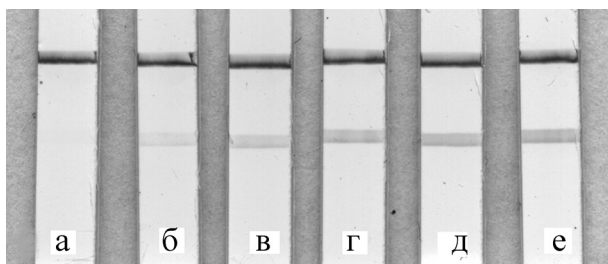


Рис. 3. Результаты определения стандартных растворов ТнI, нг/мл: а – 0; б – 0,048; в – 0,24; г – 1,2; д – 6; е – 30

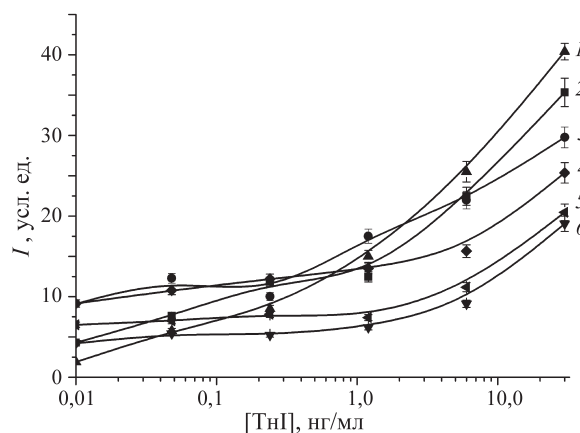


Рис. 4. Градуировочные графики, полученные для определения тропонина-I: 1 – МАТ-3, КГ МАТ-2; 2 – МАТ-2, КГ МАТ-4; 3 – МАТ-4, КГ МАТ-2; 4 – МАТ-3, КГ МАТ-4; 5 – МАТ-3, КГ МАТ-5; 6 – МАТ-2, КГ МАТ-5. Аналитическая мембрана 150-N-CNPH, впитывающая мембрана «Arista Biologicals»

В ходе дальнейшей работы были выбраны аналитическая мембрана и мембрана для нанесения образца. Было рассмотрено три вида нитроцеллюлозных мембран фирмы «MDI», отличающихся по сорбционной емкости, скорости протекания капиллярного потока и размерам пор: CNPF (10 μ), CNPC (15 μ) и 150-N-CNPH (рис. 5). Самый низкий аналитический сигнал наблюдался при использовании мембраны 150-N-CNPH, для которой время протекания жидкости составляет 125 с/4 см. Кроме того, при использовании в анализе мембраны CNPF и 150-N-CNPH наблюдалось присутствие фонового сигнала. Наибольшая чувствительность анализа и максимальный аналитический сигнал были получены при использовании мембраны CNPC с размером пор 15 μ , характеризующейся самым маленьким

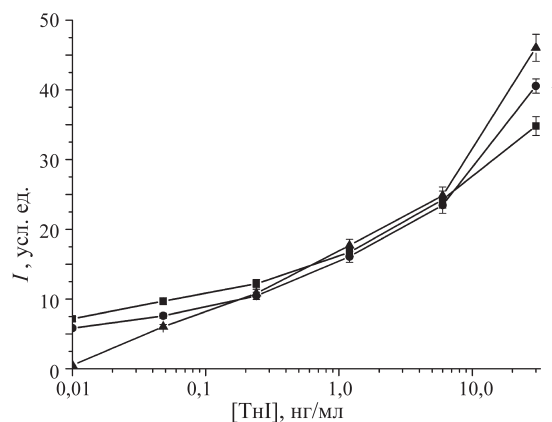


Рис. 5. Градуировочные графики для различных аналитических мембран

временем протекания жидкости (80 с/4 см). Среди исследуемых мембран для нанесения образца самая высокая чувствительность и аналитический сигнал были получены для мембраны MAPDS-0300 («*Arista Biologicals*»), которая по своей структуре сильно отличается от других проанализированных мембран (рис. 6). В остальных случаях наблюдался очень низкий сигнал. Таким образом, для дальнейших экспериментов была выбрана аналитическая мембрана CNPC (15 μ) и мембрана для нанесения образца MAPDS-0300 фирмы «*Arista Biologicals*».

На следующем этапе было изучено влияние компонентов сыворотки крови на результаты анализа (рис. 7, кривые 1, 2) и показано, что матрикс-эффект оказывает существенное влияние на аналитический сигнал, что приводит к снижению минимально определяемой концентрации тропонина-I. Возможно, это связано с тем, что на количественное определение concentra-

ции ТнI в крови может оказывать влияние ряд факторов, мешающих взаимодействию специфических антител с антигеном. Известно, что ТнI в крови находится большей частью не в свободной форме, а в форме комплексов ТнI-ТнС и ТнI-ТнТ-ТнС, и образование подобных комплексов может ухудшать связывание ТнI с антителами [7]. Был предложен подход, основанный на использовании комбинации различных пар моноклональных антител, специфичных к разным эпитопам молекулы ТнI (рис. 8). Использование смеси антител МАт-3 и МАт-5, иммобилизованных на аналитической мембране, и смеси антител МАт-2 и МАт-1, меченных коллоидным золотом, позволило значительно усилить аналитический сигнал при определении ТнI в сыворотке крови, поскольку пара антител МАт-5-МАт-1 может связываться как со свободным ТнI, так и с ТнI, находящимся в комплексе (рис. 8, кривая 1).

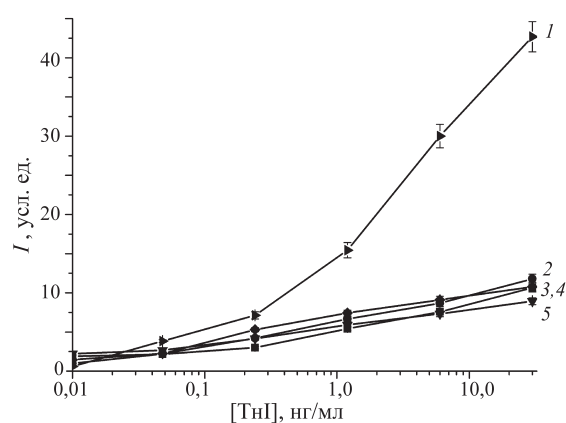


Рис. 6. Подбор мембраны для нанесения образца: 1 – «*Arista Biologicals*»; 2 – FR1 (0,35); 3 – GFB-R7; 4 – FR1 (0,6); 5 – «*Millipore*»

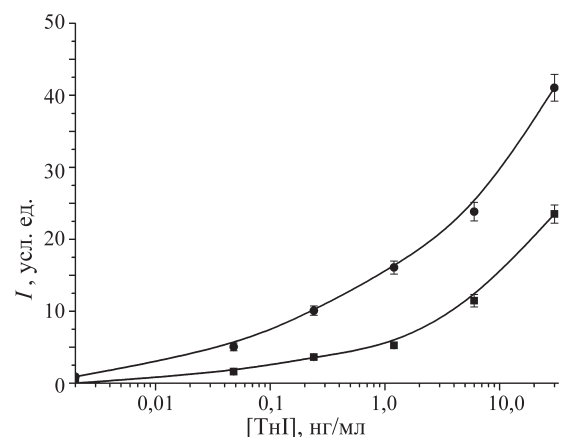


Рис. 7. Градуировочные графики, полученные для стандартов: 1 – в буферном растворе; 2 – в сыворотке крови

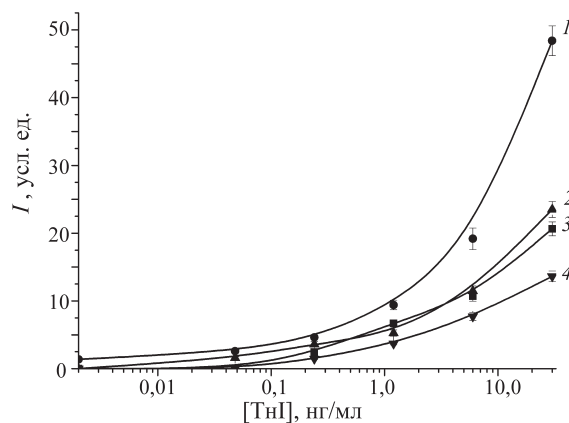


Рис. 8. Градуировочные графики, полученные для определения тропонина-I в сыворотке крови с использованием комбинации антител: 1 – МАт-3+5, КГ МАт-2+1; 2 – МАт-3, КГ МАт-2+5; 3 – МАт-3, КГ МАт-2; 4 – МАт-5, КГ МАт-1

Таким образом, в ходе проведенных исследований была разработана и оптимизирована тест-система для определения ТнІ методом ИХА в сыворотке крови человека с использованием наночастиц золота в качестве метки (нитроцеллюлозная мембрана CNPC (15 μ), мембрана для нанесения образца «Arista Biologicals», концентрация антител МАт-3, иммобилизованных на аналитической мембране, составила 1 мг/мл, а концентра-

ция конъюгата МАт-2 с наночастицами золота – 10 мкл на полоску). Разработанный метод позволяет определять концентрацию ТнІ в диапазоне концентраций 1–30 нг/мл. Предел обнаружения метода при инструментальной детекции составил 1 нг/мл ТнІ в анализируемом образце. Метод характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов, коэффициент вариации для стандартных концентраций ТнІ не превышает 10%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Затеищикова А. А., Затеищиков Д. А. // Кардиология. 1997. **37**. С. 53.
2. Naum C. // Ann. Med. 1994. **26**. P. 319.
3. Anderson P. A., Greig A. et al. // Circulat. Res. 1995. **76**. P. 685.
5. Wu A. et.al. // Clin.Chem. 1998. **44**. P. 1198.
6. Frens G. // Nature Phys. Sci. 1973. **241**. P. 20.
7. Katrukha A., Bereznikova A., Filatov V., Esakova T. // Clin. Chem. Lab. Med. 1999. **39**. P. 1091.

Поступила в редакцию 06.06.12

LATERAL FLOW IMMUNOASSAY OF HUMAN TROPONIN-I

Yakovleva E.A., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Osipov A.P.

(Division of Chemical Enzymology)

As protein analyte the human troponin-I (Tn-I) was chosen, which is specific and sensitive marker for acute myocardial infarction. Rapid lateral flow immunoassay based on colloidal gold nanoparticles as a visual marker was developed for Tn-I detection in serum. The detection limit of the method was 1 ng/ml, the variation coefficient did not exceed 10%.

Key words: immunochromatographic assay; acute myocardial infarction; human troponin-I.

Сведения об авторах: Яковлева Елена Алексеевна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (yakovlevahelena@gmail.com); Андреева Ирина Петровна – ст. науч. сотр. ЗАО «НВО Иммунотех», канд. хим. наук (imtek@newmail.ru); Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – зав. лаб. инженерной энзимологии кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, академик РАМН (alex.m.egorov@gmail.com); Осипов Александр Павлович – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (APOsipov@mail.ru).