

УДК 577.27,576.8.077

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ НА ПОВЕРХНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕЧАТНЫХ ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Г.В. Преснова, М.Ю. Рубцова, В.В. Шумянцева*, Т.В. Булко*, А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии; e-mail: gkovba@enz.chem.msu.ru)

Проведено изучение методов иммобилизации поликлональных антител на поверхности немодифицированных печатных графитовых электродов (ПГЭ) и электродов, модифицированных различными методами. Максимальный электрохимический отклик был получен на ПГЭ, покрытых пленками синтетического мембраноподобного вещества дидодециламмонийбромида (ДДАБ) с наночастицами золота. Установлено, что модификация графита пленками ДДАБ с наночастицами золота сильно изменяет морфологию поверхности, при этом существенно увеличивается интенсивность электрохимического отклика и улучшается стабильность электрохимического сигнала. При данном способе иммобилизации увеличивается концентрация иммобилизованных антител, а их активность сохраняется. Предел обнаружения ферментной метки (пероксидазы хрена) составил 0,02 нг/мл пробы.

В последние годы интенсивно проводятся исследования в области создания биосенсоров. Одно из важных направлений – создание иммуносенсоров, обладающих высокой селективностью определения, что обусловлено способностью антител к высокоспецифичному распознаванию биологически активных соединений. Это позволяет проводить анализ в реальных многокомпонентных образцах, например в сыворотке крови, в моче [1] и в продуктах питания [2, 3]. Среди аналитических методов, применяемых в качестве детектирующих систем для биосенсоров, основное место занимают методы электрохимического анализа. Наиболее активно в настоящее время разрабатываются электрохимические биосенсоры, поскольку они не требуют сложного регистрирующего оборудования, могут использоваться в полевых условиях, а также могут быть имплантированы в человеческий организм для непрерывного мониторинга различных биологически активных соединений.

Как правило, в биосенсорах биологический компонент находится в иммобилизованном состоянии, поэтому аналитические параметры биосенсоров зависят от сохранения свойств биомолекул в процессе иммобилизации.

Цель настоящей работы состояла в изучении различных методов иммобилизации специфических антител на графитовых электродах, полученных методом

трафаретной печати. Данные электроды обладают рядом преимуществ: большой рабочей поверхностью, простотой конструкции и эксплуатации, хорошей воспроизводимостью, миниатюрностью, низкой себестоимостью изготовления и высокой стандартизацией. Иммунологическую активность иммобилизованных антител определяли при комплексообразовании их с антигеном, меченным электрохимически активной меткой (пероксидазой хрена). В качестве модельного антигена использовали хлорамфеникол (ХАФ) – противобактериальный антибиотик широкого спектра действия. Он достаточно часто применяется в ветеринарии и животноводстве для лечения ряда инфекционных заболеваний животных и птиц. Вследствие этого существует реальная опасность попадания остаточных количеств этого антибиотика в продукты питания животного происхождения, поэтому актуальной является разработка быстрого и высокочувствительного метода определения хлорамфеникола в продуктах питания.

Материалы и методы

В работе использовали дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия, катехол (“Sigma-Aldrich”, США), пероксидазу хрена (RZ 3.3) (“Biozyme”, Англия), пероксид водорода, ферроцианид, кислоты, щелочи, казеин, компоненты

*Институт биомедицинской химии РАН (Погодинская улица, 10, 119121, Москва).

буферных растворов (“Химмед”, Россия), поликлональные антитела кролика к хлорамфениколу (ЗАО “НВО Иммунотех”, Россия), трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати, с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (ООО НПП “ЭЛКОМ”, Россия). Конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена (ХАФ-ПХ) получали по стандартному методу активированных эфиров [4]. Для приготовления буферных растворов использовали деионизованную воду (“Milli-Q System”, “Millipor”).

Спектральные исследования проводили на спектрофотометре “UV 1602” (“Shimadzu”, Япония), электрохимические измерения – на потенциостате “Autolab” (“Eco Chemie”, Нидерланды), снабженном программным обеспечением GPES. Электрохимические исследования проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4), диаметр рабочего электрода 2 мм. Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости сканирования от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV): начальный потенциал 200 мВ, конечный – 700 мВ (для восстановительных процессов), шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц. Параметры, используемые при дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV): амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 200 мВ, конечный – 700 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс. Все измерения проводили при комнатной температуре.

Модификация печатных электродов наночастицами золота и ДДАБ. Синтез коллоидного раствора золота, стабилизированного ДДАБ, проводили следующим образом: к 1 мл раствора 0,1 М ДДАБ в хлороформе прибавляли при перемешивании 0,5 мл 10 мМ водного раствора $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Далее при интенсивном перемешивании медленно прибавляли 0,2 мл свежеприготовленного 0,4 М раствора NaBH_4 в воде. Через 2 ч окрашенный органический слой отделяли и промывали равным объемом воды. Коллоидный раствор золота, стабилизированный ДДАБ в хлороформе, характеризовали с помощью абсорбционной спектроскопии: $\lambda_{\text{макс}} = 520$ нм [5, 6]. Концентрацию наночастиц золота в 0,1 М ДДАБ в хлороформе рассчитывали в соответствии со стехиометрией реакции (5 мМ).

Анодное окисление графитовых печатных электродов проводили в течение 5 мин в электрохимической ячейке, содержащей ацетатный буфер (потенциал 5 мВ).

Иммобилизация антител на графитовых печатных электродах. На поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 2 мкл раствора антител. Электроды оставляли на 12 ч при 4°C во влажной камере, чтобы предотвратить их полное высыхание. Затем полученный электрод отмывали в растворах PBS и PBST в проточной системе в течение 5 мин (скорость потока 1 мл/мин). Для предотвращения неспецифического связывания электрод инкубировали в 0,5%-м казеине в течение 30 мин при 37°C. Для изучения комплексообразования антител с антигеном пропускали раствор конъюгата ХАФ-ПХ в PBS. После отмывки электрод помещали в электрохимическую ячейку и определяли электрохимическую активность пероксидазы на поверхности электрода при пропускании субстрата – пероксида водорода (0,5 мМ) и медиатора – катехола (0,1 мМ). В качестве аналитического сигнала использовали величину максимального электрохимического тока.

Характеристика поверхности электродов методом SEM. Поверхность электродов была охарактеризована с помощью сканирующего электронного микроскопа “Stereoscan-240” (“Cambridge Instruments”, Англия).

Результаты и обсуждение

Необходимость разработки высокочувствительных методов анализа для проведения мониторинга различных соединений в реальных объектах требует создания аналитических устройств с хорошей чувствительностью, воспроизводимостью и высокой операционной стабильностью. При разработке иммуносенсоров важной задачей является поиск способа иммобилизации, обеспечивающего необходимую концентрацию биораспознающего элемента на поверхности электрода, а также сохранение способности антител к комплексообразованию с антигеном.

Для иммобилизации специфических антител на поверхности графитовых электродов использовали различные подходы: физическую адсорбцию на поверхности как необработанных электродов, так и на электродах, предварительно обработанных методом анодного окисления, а также иммобилизацию на электродах, модифицированных мембраноподобным синтетическим веществом и наночастицами золота. Для характеристики поверхности электродов использовали метод сканирующей электронной микроскопии [7].

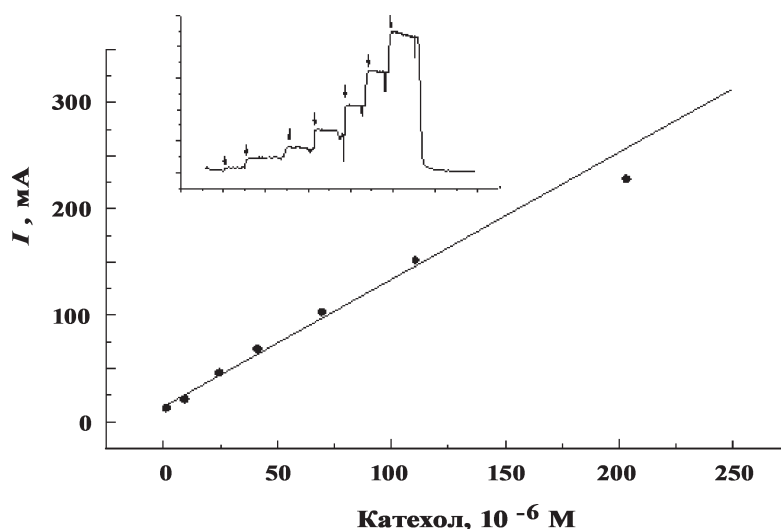


Рис. 1. Зависимость величины электрохимического тока от концентрации катехола в проточной ячейке

Активность иммобилизованных антител определяли по величине электрохимического отклика после комплексообразования иммобилизованных антител с конъюгатом ХАФ-ПХ. В этом случае образование иммунных комплексов на поверхности электрода можно регистрировать по наличию ферментативной активности метки – пероксидазы хрена, которая прямо пропорциональна концентрации иммунных комплексов на поверхности. Предварительно провели оптимизацию условий электрохимической детекции пероксидазы хрена на поверхности печатных графитовых электродов. При использовании в качестве распознающего элемента биосенсоров антител, имеющих достаточно большой размер, не удалось осуществить прямой перенос электронов от биокатализатора (пероксидазы) на поверхность электрода, поэтому использовали медиатор – катехол. Градуировочная зависимость величины тока от концентрации медиатора приведена на рис. 1. Существует оптимальная концентрация медиатора, обеспечивающая максимальный сигнал. При избытке медиатора наблюдалось падение сигнала, что вызвано инактивацией иммобилизованных белков. Подобные зависимости были получены для субстрата пероксидазы – пероксида водорода. Таким образом, были определены оптимальные концентрации реагентов (субстрата и медиатора) для определения активности пероксидазы в составе конъюгата с хлорамфениколом.

На рис. 2 представлены результаты изучения поверхности нативных электродов и электродов с иммобилизованными антителами методом сканирующей

электронной микроскопии. Морфология поверхностей нативного графитового электрода и электрода, обработанного методом анодного окисления, практически одинакова (рис. 2, а, б). Она существенно не менялась после иммобилизации антител методом физической адсорбции (рис. 2, в), что свидетельствует о малой степени заполнения поверхности электрода белком. Результаты электрохимической детекции образования комплексов антител с конъюгатом ХАФ-ПХ на поверхности необработанных электродов и электродов после анодного окисления приведены на рис. 3. Предварительное анодное окисление электрода позволяет увеличить электрохимический отклик сенсора почти в 3 раза.

Для улучшения способности графита связывать антитела поверхность электрода обрабатывали синтетическим мембраноподобным поверхностно-активным веществом дидодециламмонийбромидом (ДДАБ) [8, 9]. Известно, что мембраноподобные вещества способны образовывать на поверхности электрода стабильную лиотропную жидко-кристаллическую пленку, содержащую достаточное количество воды для сохранения структуры и активности белков. Использование подобных пленок для иммобилизации белковых молекул позволяет провести сорбцию в более мягких условиях, а также сохранить нативную конформацию белков и, следовательно, их максимальную активность. Ранее было показано, что использование ДДАБ позволяет эффективно улучшить электрохимические свойства иммобилизованных белков. Процесс иммобилизации белка или других макромолекул очень

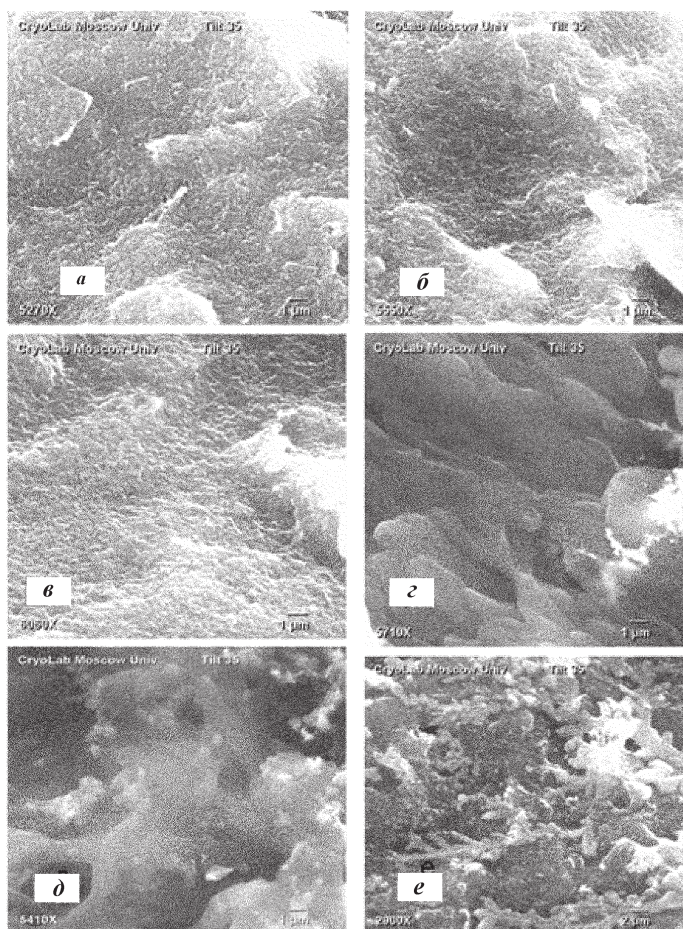


Рис. 2. Поверхностные структуры ПГЭ, полученные методом сканирующей электронной микроскопии: *a* – ПГЭ; *b* – ПГЭ после анодного окисления; *в* – ПГЭ после анодного окисления с иммобилизованными антителами; *г* – ПГЭ, обработанный ДДАБ и коллоидным золотом; *д*, *e* – ПГЭ, обработанный ДДАБ и коллоидным золотом, с иммобилизованными антителами (*д*) и конъюгатом (*e*) соответственно

часто приводит к его частичной денатурации, что ведет к образованию изоляционного слоя и препятствует переносу электронов [10, 11]. Частично решить эту проблему позволяет введение в раствор ДДАБ частиц коллоидного золота, действующих как мостик для переноса электронов от белка к поверхности электрода [12, 13].

Результаты изучения структуры поверхности электродов, обработанных ДДАБ, а также электродов с иммобилизованными антителами в пленках ДДАБ и смеси ДДАБ с наночастицами золота представлены на рис. 2, *в*, *г*. При использовании ДДАБ морфология поверхности существенно меняется, добавление наночастиц золота приводит к образованию относительно гладкой пленки, которая меняет свои характеристики при дальнейшей иммобилизации на нее антител и конъюгата ХАФ-ПХ (рис. 2, *д*, *e*). В этом случае можно говорить о существенном увеличении количе-

ства активного иммобилизованного белка на поверхности электрода.

Данные по сравнению максимальных электрохимических откликов и стабильности сигнала электродов с антителами, иммобилизованными различными методами, приведены в таблице. Наиболее высокий сигнал и высокая операционная стабильность характерны для электродов с антителами, иммобилизованными в пленках ДДАБ с наночастицами золота. Предел обнаружения пероксидазы в конъюгате ХАФ-ПХ на поверхности электрода составил 0,02 нг/мл пробы. Калибровочная кривая для определения пероксидазы хрена в составе белкового конъюгата в проточной

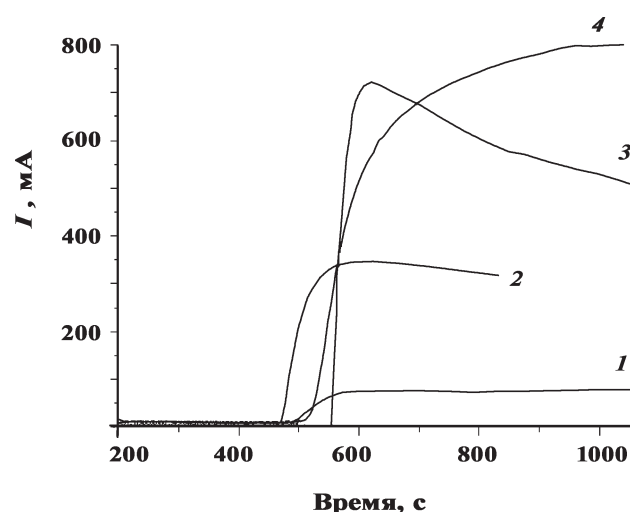


Рис. 3. Электрохимический отклик иммуносенсора при разных способах иммобилизации антител на поверхности графитовых электродов: 1 – ПГЭ; 2 – ПГЭ с предварительным анодным окислением; 3 – ПГЭ, обработанный ДДАБ; 4 – ПГЭ, обработанный раствором ДДАБ и коллоидного золота

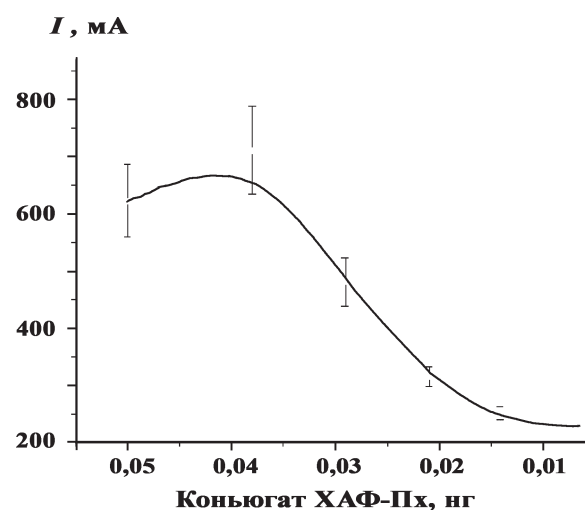


Рис. 4. Калибровочная кривая для определения пероксидазы хрена в составе белкового конъюгата в проточной ячейке, содержащей катехол и пероксид водорода

Аналитические характеристики печатных графитовых электродов с антителами, иммобилизованными различными методами

Способ иммобилизации/параметр	Адсорбция на графите	Адсорбция на графите, предобработанном методом анодного окисления	Иммобилизация в пленке ДДАБ	Иммобилизация в пленке ДДАБ и наночастиц золота
$I_{\text{макс}}$, нА	100	340	750	790
Остаточная активность через 1 ч, %	98	75	70	95

ячейке, содержащей катехол и пероксид водорода, представлена на рис. 4.

Таким образом, модификация печатных электродов пленками ДДАБ с наночастицами золота позволяет

получить достаточно чувствительную систему, которую можно использовать для разработки высокочувствительных иммуносенсоров с пероксидазой в качестве метки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Conneely G., Aherne M., Lu H., Guilbault G.C.* // Anal. Chim. Acta. 2007. **583**. P. 153.
2. *Park I.-S., Kim D.-K., Adanyi N., Varadi M., Kim N.* // Biosens. Bioelectron. 2004. **19**. P. 667.
3. *Agui L., Guzman A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M.* // Anal. Chim. Acta. 2002. **461**. P. 65.
4. *Wittmann C., Hock B.* // Food and Agricultural Immunology. 1989. **1**. P. 211.
5. *Han X., Cheng W., Zhang Z., Dong S., Wang E.* // Biochim. Biophys. Acta. 2002. **1556**. P. 273.
6. *Berthell D., Brust M., Schiffrin D.J., Kiely C.* // J. Electroanal. Chem. 1996. **409**. P. 137.
7. *Ordonez S.S., Fabregas E.* // Biosens. Bioelectron. 2007. **22**. P. 965.
8. *Tang J., Wang B., Wu Z., Han X., Dong S., Wang E.* // Biosens. Bioelectron. 2003. **18**. P. 867.
9. *Chen X., Xie H., Kong J., Deng J.* // Biosens. Bioelectron. 2001. **16**. P. 115.
10. *Shumyantseva V.V. et al.* // Journal of Inorganic Biochemistry 2007. **101**. P. 859.
11. *Rusling J.F.* // Acc. Chem. Res. 1998. **31**. P. 363.
12. *Zhang L., Sun X., Song Y., Jiang X., Dong S., Wang E.* // Langmuir. 2006. **22**. P. 2838.

Поступила в редакцию 23.11.07

COMPARATIVE IMMOBILIZATION OF ANTIBODIES ON A SURFACE OF MODIFIED SCREEN-PRINTED GRAPHITE ELECTRODES

G.V. Presnova, M.Yu. Rubtzova, V.V. Shumyantseva, T.V. Bulko, A.M. Yegorov

(Division of Chemical Enzymology)

The study of immobilization of polyclonal antibodies on a surface of screen-printed graphite electrodes (SPE) was carried out. The methods examined involved physical adsorption and the immobilization in the films of DDAB and films of DDAB and gold nanoparticles. The maximal electrochemical response was registered on the SPE modified by films of DDAB and gold nanoparticles. We have found that such films change markedly the surface morphology and the electrochemical signal is more intensive and stable. In this case the concentration of the immobilized antibodies increases, their activity remains. The detection limit for enzyme label (horseradish peroxidase) was 0.02 ng/ml of probe.