

УДК 616:612.017.1

ГРАДИЕНТНЫЙ ЛАТЕРАЛЬНЫЙ ПРОТОЧНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА

К.В. Серебrenникова^{1*}, Ж.В. Самсонова¹, А.П. Осипов²

¹химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова; ²НИТУ «МИСиС»
*e-mail: ksenijasereb@mail.ru

Предложен новый формат экспресс-метода визуального полуколичественного анализа, основанный на принципе градиентного латерального проточного иммуноанализа с наночастицами золота в качестве метки. В аналитической зоне тест-устройства сформировано несколько тестовых линий с увеличивающейся концентрацией иммобилизованных на мембране специфических антител. Полуколичественная оценка содержания антигена проводится визуально путем подсчета числа видимых окрашенных полос в аналитической зоне. На примере гормона хорионического гонадотропина человека показана возможность бесприборного полуколичественного определения антигена в области от 50 до 10 000 мЕд/мл в течение 5–10 мин в пяти диапазонах концентраций: менее 100 мЕд/мл, 100–300, 300–500, 500–800 и более 800 мЕд/мл. Разработанный полуколичественный экспресс-метод позволяет визуально по числу окрашенных линий определять диапазон концентраций хорионического гонадотропина человека в моче в целях диагностирования беременности и ее протекания.

Ключевые слова: градиентный латеральный проточный иммуноанализ, хорионический гонадотропин человека, наночастицы золота.

В настоящее время в клинической диагностике, мониторинге окружающей среды, пищевой промышленности и др. областях возрастает потребность в простых и быстрых методах анализа и тест-системах, не требующих использования дорогостоящих приборов для регистрации результатов. К таким методам относится латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА), известный также как иммунохроматографический анализ [1]. ЛПИА проводится с помощью специальных тест-полосок с заранее импрегнированными в них компонентами, которые активируются при нанесении жидкого образца. В результате в тестовой зоне появляется окрашенная линия, интенсивность которой пропорциональна концентрации определяемого антигена в растворе. По сравнению с обычными аналитическими методами, ЛПИА обладает рядом преимуществ, такими как низкая стоимость, быстрота и простота проведения, а также возможность визуальной по принципу «да-нет» или приборной количественной оценки результатов [2]. В последние годы в ЛПИА предлагаются новые форматы аналитических устройств, которые позволяют определять не только одно или несколько соединений по принципу «да-нет», но и проводить количественный анализ по

измерению с помощью отражательного фотометра интенсивности окраски одной или нескольких тестовых полос, каждая из которых содержит специфические антитела против отдельно определяемого антигена [3].

В настоящей работе рассмотрен новый формат ЛПИА, обеспечивающий быстрое полуколичественное определение биомаркеров белковой природы без использования специальных приборов [4]. Основное отличие градиентного ЛПИА от традиционного состоит в формировании в аналитической зоне устройства нескольких параллельных тестовых линий с разной концентрацией специфических антител, возрастающей от линии к линии. Первоначально принцип проведения градиентного анализа был сформулирован и реализован нами ранее на примере аналогичной системы анализа с тонкой проточной кюветой, в которой находилась бумажная мембрана с ковалентно фотоиммобилизованными антителами в виде нескольких линий с увеличивающейся концентрацией антител [5]. Полуколичественную оценку результатов анализа проводили путем соотнесения числа проявившихся полос на мембране в тестовой зоне с диапазоном концентраций определяемого аналита. В качестве модельной системы для раз-

работки градиентного ЛПИА был выбран хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) – гормон, известный маркер беременности, широко использующийся при ее самодиагностике.

Экспериментальная часть

В работе использовали химические реактивы фирмы «Sigma» (США), неорганические соли фирмы «Helicon» (Россия), пять клонов моноклональных антител к ХГЧ фирмы «Диатех-Эм» (Россия) и «Биалекса» (Россия), ХГЧ (ФГУП «Московский эндокринный завод») и мембраны фирмы «MDI» (Индия). В работе использовали 10 мМ фосфатный солевой буфер с рН 7,2–7,4 (ФБС) и ФБС, содержащий 0,1% Твин-20 (ФБСТ). Стандартные растворы ХГЧ готовили в ФБСТ или моче, не содержащей ХГЧ, из исходного раствора ХГЧ с концентрацией 500 МЕ/мл.

Синтез коллоидного золота размером 30 нм проводили по методу Френса [6]. Полученные наночастицы золота были охарактеризованы спектрально в диапазоне 400–900 нм на спектрофотометре «Thermo Scientific Multiscan GO» (США) и методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), «JEOL JEM-2100» (Япония).

Для получения специфических моноклональных антител против ХГЧ, меченных наночастицами золота, раствор коллоидного золота (10 мл) доводили до рН 7,0–7,5, добавляли 1 мл антител с концентрацией 10 мкг/мл. Смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли БСА, сахарозу и азид натрия до конечных концентраций 0,1; 10 и 0,01% соответственно. Для удаления несвязавшихся бел-

ков конъюгат центрифугировали (11000 g, 20 мин при 4 °С). Супернатант удаляли, а осадок перерастворяли в определенном объеме ФБС, содержащем 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия. Полученный раствор с конъюгатом наносили на стекловолоконную мембрану для конъюгата РТ-R5 («MDI», Индия) размером 4×4 мм в концентрации, соответствующей $A_{520} = 2$ опт. ед., и высушивали при комнатной температуре.

Тест-полоску для ЛПИА формировали на узкой пластиковой подложке (4×80 мм) последовательным наклеиванием мембранных носителей для образца, конъюгата, аналитической и впитывающей мембраны («MDI», Индия), согласно схеме, представленной на рис. 1.

В тестовую зону аналитической нитроцеллюлозной мембраны наносили растворы специфических антител с подобранными возрастающими концентрациями в диапазоне от 0,1 до 1,0 мг/мл с помощью автоматического диспенсера «BioJetQuanti 3000, BioDot XYZ 3050» («BioDot», США). В качестве контрольной зоны на тест-полоске использовали белок А. Полоски высушивали в течение 24 ч при комнатной температуре и хранили при этой же температуре в герметичной упаковке. Раствор конъюгата специфических антител, меченных наночастицами золота, наносили на мембрану для конъюгата РТ-R5 и высушивали при комнатной температуре. Для проведения градиентного ЛПИА на мембрану для образца тест-полоски наносили 120 мкл стандартных растворов с определенными концентрациями ХГЧ в ФБСТ или моче, не содержащей ХГЧ. Через 15 мин проводили

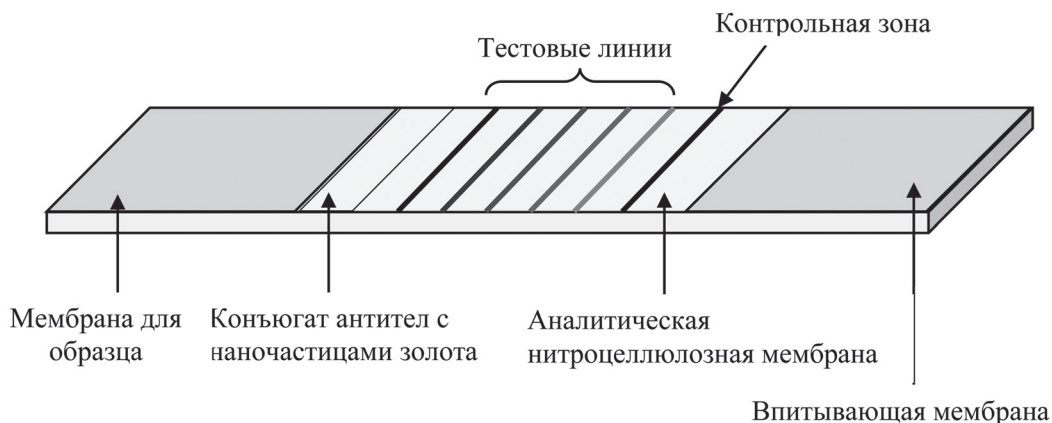


Рис. 1. Схема тест-полоски для проведения градиентного ЛПИА

визуальную и полуколичественную оценку результатов.

Результаты и обсуждение

В качестве модельного белка для проведения ЛПИИ был выбран хорионический гонадотропин человека, вырабатываемый плацентой сразу после имплантации. Имплантация происходит в среднем через 9 дней после овуляции (диапазон составляет 6–12 дней) или примерно за 5 дней до начала менструации. Уровень ХГЧ выявляется в крови уже через 2–3 дня, а в моче – через 3–4 дня после имплантации. Уровень ХГЧ, превышающий 25 мЕд/мл, свидетельствует о наличии беременности. Каждые 72 ч уровень ХГЧ увеличивается в среднем вдвое и достигает пика в первые 8–11 недель беременности. До 15-й недели уровень ХГЧ снижается, а затем остается на постоянном уровне до конца срока беременности [7].

В качестве метки специфических антител для дальнейшего использования в иммуноанализе были получены коллоидные наночастицы золота. Анализ спектров поглощения (пик в области 530 нм) и результатов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) позволил сделать вывод о сферической форме наночастиц золота (средний диаметр $30 \pm 1,5$ нм). Путем титрования было установлено, что для получения стабильных конъюгатов антител с золотом оптимальны растворы антител с рН 7,0–7,5 и минимальной концентрацией антител, необходимой для получения стабильного конъюгата (10–15 мкг/мл). В работе были использованы пять пар моноклональных антител против ХГЧ. Подходящую пару антител (наилучшую комбинацию), проявляющую наиболее высокую чувствительность в анализе, выбирали путем изучения различных комбинаций имеющихся антител.

Для реализации метода градиентного ЛПИИ в аналитической зоне мембраны сорбционно

иммобилизовали антитела в виде поперечных линий с увеличивающейся концентрацией антител. При нанесении образца на тест-полоску раствор взаимодействовал с конъюгатом наночастиц золота с антителами. Следует учесть, что ввиду избытка антител на поверхности золотых наночастиц определяемый антиген должен находиться преимущественно в виде иммунокомплекса. Дальнейшее образование иммунокомплексов на носителе характеризуется константой равновесия между свободными антителами на носителе и свободным антигеном, поэтому по достижении зон с иммобилизованными антителами при образовании более сложного сэндвич-комплекса на мембране окрашенная линия появляется лишь при достижении и превышении определенной концентрации антител на носителе. На рис. 2 показаны результаты эксперимента при нанесении на тест-полоску приготовленных стандартных растворов ХГЧ в моче с градиентно иммобилизованными антителами в виде пяти линий. Область определяемых концентраций разработанной тест-системы составила 50–10 000 мЕд/мл, время анализа не превышало 10 мин. Полуколичественную оценку содержания антигена в узком диапазоне концентраций проводили визуально путем подсчета числа видимых окрашенных полос в аналитической зоне, при этом число (N) возможных диапазонов определяемых концентраций, где $N \geq 2$, соответствовало числу нанесенных линий антител ($N - 1$). В диапазоне концентраций 50–100 мЕд/мл в аналитической зоне проявлялись одна-две окрашенные линии, при концентрации 250–400 мЕд/мл видны три окрашенные линии, при концентрации 500–600 мЕд/мл – четыре окрашенные линии, а при концентрации выше 800 мЕд/мл – пять окрашенных линий.

Таким образом, в результате проведенного исследования был показана возможность использования предложенного нами метода градиентного ЛПИИ для определения ХГЧ

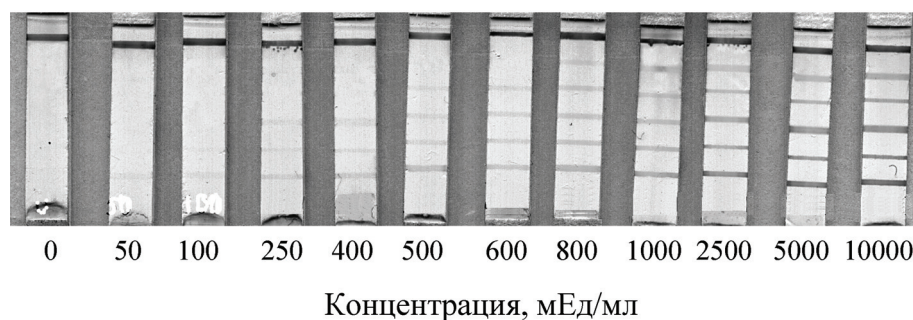


Рис. 2. Градиентный ЛПИИ в образцах мочи с разной концентрацией ХГЧ

(модельного гормона, маркера беременности) использован для создания систем визуального самоконтроля протекания беременности без использования приборной оценки результатов анализа.

Работа выполнена в соответствии с госзаданием Минобрнауки «Организация проведения научных исследований», соглашение №16.6548.2017/ВУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bahadır E.B., Sezgintürk M.K. // Trends Anal. Chem. 2016. Vol. 82. P. 286.
2. Осипов А.П., Самсонова Ж.В., Кондаков С.Э. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 56. № 3. С. 164.
3. Safenkova I.V., Pankratova G.K., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Vengerov Yu.Yu., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Anal. Bioanal. Chem. 2016. Vol. 408. N 22. P. 6009.
4. Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Кондаков С.Э. // Пат. РФ № 2510510.
5. Gorovitz B.M., Osipov A.P., Egorov A.M. // J. Immunol. Methods. 1993. Vol. 193. P. 157
6. Frens G. // Nature Phys. Sci. 1973. Vol. 241. P. 20.
7. Visconti K., Zite N. // Clin. Obstet. Gynecol. 2012. Vol. 55. P. 410.

Поступила в редакцию 10.06.17

GRADIENT LATERAL FLOW IMMUNOASSAY OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN

K.V. Serebrennikova^{1*}, J.V. Samsonova¹, A.P. Osipov²

¹Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University; ²National University of Science and Technology "MISIS" *e-mail: ksenijasereb@mail.ru

A new format of visual semi-quantitative express method, which is based on the principle of gradient lateral flow immunoassay with gold nanoparticles as a label was proposed. Several test lines with increasing concentration of specific antibodies immobilized on the membrane were formed in the analytic zone of the test strip. Semi-quantitative analysis of antigen was carried out visually by counting colored lines in analytic zone. As a model antigen the human chorionic gonadotropin was chosen and the possibility of semi-quantitative determination of analyte without any device in the range from 50 to 10000 mU/mL during 5–10 minutes in five concentration ranges: less than 100 mU/mL; 100–300; 300–500; 500–800 and more than 800 mU/mL was shown. The developed semi-quantitative express method allows to determine the concentration range of human chorionic gonadotropin in urine by number of colored lines for diagnosis of pregnancy and its course.

Key words: gradient lateral flow immunoassay; human chorionic gonadotropin; gold nanoparticles.

Сведения об авторах: Серебренникова Ксения Вячеславовна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (ksenijasereb@mail.ru); Самсонова Жанна Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (jvsamsonova@gmail.com); Осипов Александр Павлович – ст. науч. сотр. кафедры ФНСиВТМ Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», канд. хим. наук (aopipov@mail.ru).