РОЗШИРЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ ІМУНОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

К. ф.-м. н. Р. В. Христосенко[1], к. ф.-м. н. К. В. Костюкевич[1], Ю. В. Ушенін[1], д. б. н. Є. М. Макогоненко[2], к. х. н. Г. К. Березницький[2], чл.-кор. Е. В. Луговської[2], к. б. н. Л. П. Урвант[2], к. б. н. І. М. Колєснікова[2], П. Ю. Цап[2]

[1]Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України,
[2]Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Україна, м. Київ
khristosenko@ukr.net

Досліджено фізичні та біохімічні аспекти розробки імуносенсорного приладу з призмовим типом збудження (конфігурація Кречмана) поверхневого плазмонного резонансу у плівці золота при механічному скануванні кута падіння монохроматичного світла для достовірного детектування рівня фібриногену та його фрагментів у плазмі крові людини. З метою підвищення чутливості сенсору запропоновано методику розрахунку кінетичних параметрів реакції асоціації «антитіло — антиген» та застосовано додатковий канал порівняння відгуку для виключення шуму температурних флуктуацій.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, чутливість, імуносенсор, антитіла, фібриноген.

Важливими біохімічними маркерами стану системи гемостазу крові людини в нормі і при різних захворюваннях серцево-судинної системи є фібриноген та його фрагменти [1]. Методика поверхневого плазмонного резонансу (ППР) на сьогодні є найбільш розвиненою оптичною сенсорною технологією, яка широко застосовується для прямого кількісного дослідження молекулярної взаємодії хімічних та біологічних речовин у масштабі реального часу без міток [2]. Поверхневі плазмони (ПП) — це нормальні моди щільності заряду, що існують на межі поділу між діелектриком та металом. Зв'язування ПП з електромагнітним полем збуджуючого світла характеризується резонансною кривою ППР, форма та положення мінімуму якої вкрай чутливі до зміни діелектричних властивостей середовища біля поверхні металу (золота). Для дослідження біомолекулярних взаємодій золоту поверхню модифікують тонким шаром чутливого матеріалу. Використання імунної реакції «антитіло — антиген» (особливо з використанням моноклональних антитіл — монАТ) як основи для побудови біосенсору дозволяє отримати унікальні специфічні відгуки та виконувати аналізи складних біологічних сумішей — плазми крові, сечі, слини [3].

Метою біохімічної частини досліджень була розробка методу визначення кінетичних параметрів реакцій асоціації фібриногену, фібрину та Х-фрагментів фібрину з фібрин(оген)-специфічними монАТ із застосуванням ППР-спектрометра типу «Плазмон» і на цій основі — програми для кількісної оцінки стабільності утворюваних комплексів «антитіло — антиген». Фібрин(оген)-специфічні монАТ були отримані у відділі молекулярної імунології ІБХ НАНУ. Фібриноген, фібрин-мономер і тромбін виділили із плазми крові донорів; Х-фрагмент фібриногену очистили із плазмінового гідролізату Фг; реакцію асоціації комплексів «антитіло — антиген» досліджували в 0,02 М HEPES буфері, pH 7,4, що містив 0,3 М NaCl.

Було розроблено імуносенсорні чипи, на поверхню яких ковалентно іммобілізували фібрин- і фібриноген-специфічні монАТ I-3c і II-4d відповідно. Для кожного з іммобілізованих монАТ були отримані серії сенсорограм для реакцій зв'язування з фібрином, Фг та Х-фрагментом Фг у різних концентраціях. Реакції асоціації були проведені в модельних системах, сформованих із очищених протеїнів і в плазмі крові. Кожну сенсорограму аналізували із застосуванням комп'ютерного фітингу з використанням програми Sigma plot. Отримані параметри дозволили розрахувати кінетичні константи швидкості утворення (k_a) і дисоціації (k_d) комплексів «антитіло — антиген» та визначити константу дисоціації (K_d) на основі окремої сенсорограми. Було показано, що значення константи

дисоціації для реакції взаємодії монАТ І-3с з Х-фрагментом фібрину desAB та для взаємодії монАТ І-3с з фібрином desAB дорівнювали 9,1 і 1,1 нМ відповідно, що вказує на зміну структури неоантигенної детермінанти після відщеплення від молекули фібрину αС-регіонів. Значення констант дисоціації для реакцій взаємодії моноклональних антитіл із фібриногеном і фібрином desAB, розчиненими у плазмі крові, складали 81 і 11,7 нМ, а в робочому буфері — 17 і 1,1 нМ відповідно. Це свідчить, що спорідненість моноклональних антитіл до досліджуваних протеїнів, розчинених у плазмі крові, слабша, ніж у робочому буфері. З використанням отриманих даних була розроблена програма розрахунку кінетичних параметрів реакції асоціації «аналіт — ліганд» для приладів серії «Плазмон» виробництва ІФН НАН України.

Також проведено аналіз впливу шумових ефектів приладу типу «Плазмон» на одержання достовірних результатів досліджень із максимальною чутливістю. Повний шум сенсора ППР, який встановлює найменшу межу вимірюваних змін коефіцієнта заломлення, містить: шум детектування випромінювання; флуктуації від джерела світла, у значній мірі зумовлені електронним шумом та якістю контролюючої електроніки; термічний шум, викликаний температурними флуктуаціями; шум механічних флуктуацій, флуктуації потік/тиск через роботу насоса, що подає пробу в кювету. Найбільш вагомими є ефекти температурних флуктуацій, які мають різне походження. З ростом температури коливання поверхневих плазмонів значно послабляються через збільшення електрон-фононного розсіювання в металі. Зміна температури впливає на роботу компонентів сенсора (вихідний сигнал джерела світла, відгук детектора) та на швидкість і/або ефективність молекулярної взаємодії. Та найбільший вплив здійснює температурно-залежний коефіцієнт заломлення проби n (n води змінюється на 10^{-5} RIU при зміні температури на 0,1°С, що близько до межі детектування приладів ППР).

Для виключення шуму температурних флуктуацій застосовано принципи компенсації — розроблено прилад з додатковим контрольним каналом, показання якого зчитуються паралельно з робочим. У приладі використано одне джерело світла, промінь якого розділяється на два за допомогою спеціально розробленої світлороздільної призми. Світлороздільна призма є основним елементом схеми, відповідальним за формування двох променів світла з однаковою поляризацією, без заломлення і зі зсувом щодо осі випромінювача. Тільки в такому випадку у двох каналах одержуються ідентичні резонансні криві ППР. Було проведено теоретичний розрахунок і оптимізацію конструкції щодо розмірів і взаємного розташування елементів оптичного блоку приладу. Якщо під час тривалих вимірювань будуть відбуватися зміни показника заломлення аналіта, не пов'язані з адсорбцією або взаємодією молекул (наприклад, зміна температури), це призведе до зміни відгуку приладу і буде зафіксовано за допомогою референтного каналу, що підвищить точність і достовірність вимірювань.

ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наукова думка, 2013.

2. Дорожинський Г.В., Маслов В.П., Ушенін Ю.В. Сенсорні прилади на основі поверхневого плазмонного резонансу.— Київ: НТУУ «КПІ», 2016.

3. Луговський Е.В., Комісаренко С.В. Моноклональные антитела как инструмент исследования полимеризации фибрина // Биоорган. химия.— 2000.— Т. 26, № 12.— С. 883—891.

———————

R. V. Khrystosenko, E. V. Kostyukevich, Yu. V. Ushenin, E. M. Makogonenko, G. K. Bereznickiy, E. V. Lugovskoi, A. S. Dubovecki, L. P. Urvant, I. N. Kolesnikova, P. Yu. Tsap

Expansion of analytical capabilities of immunosensors based on surface plasmon resonance

The authors investigate physical and biochemical aspects of the development of immunosensor devices with surface plasmon resonance (SPR) excitation by means of the glass prism (Kretchmann configuration) in the gold film with mechanical scanning of the angle of incidence of monochromatic light for reliable detection of fibrinogen and its fragments in the human blood serum. To improve the sensitivity of the sensor, a method for computation of the kinetic parameters of antigen-antibody binding reaction is proposed, and additional reference response channel is used to compensate for the temperature fluctuations induced noise.

Keywords: surface plasmon resonance, sensitivity, immunosensor, antibodies, fibrinogen.