



ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВЫХ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОКЕРАМИЧЕСКОГО БИОЧИПА

DETECTION OF PROTEIN BIOMACROMOLECULES USING PIEZOCERAMIC BIOCHIP

УДК 543.07, ВАК 05.11.13, DOI: 10.22184/1993-8578.2017.79.8.44.48

А.Ахметова^{1,2}, И.Назаров², Г.Преснова¹, М.Рубцова¹, А.Егоров¹, И.Яминский^{1,2}
A.Ahmetova^{1,2}, I.Nazarov², G.Presnova¹, M.Rubtsova¹, A.Egorov¹, I.Yaminsky^{1,2}

Рассмотрены конструкция пьезокерамического кантileверного биочипа и способы обнаружения с его помощью белковых макромолекул для использования в медицине.

The design of the piezoceramic cantilever biochip and methods for detecting protein macromolecules for use in medicine are considered.

Применение методов зондовой микроскопии для обнаружения биологических макромолекул является относительно новым направлением. Ранее нами были представлены способы обнаружения вирусов [1] и ДНК [2, 3] с помощью пьезокерамических датчиков. В частности, для обнаружения вируса гриппа А предложен биосенсор, в котором в качестве биоспецифических распознающих реагентов используются сиаловые кислоты, которые способны связываться с гемагглютинином оболочки вируса. Для обнаружения ДНК могут применяться пьезокерамические биочипы, на поверхности которых иммобилизованы олигонуклеотидные зонды известной последовательности. Принцип определения основан на гибридизации этих зондов с комплементарными фрагментами молекул ДНК из анализируемого образца.

Цель данной работы – проверка активности антител на микроальбумин для дальнейшей разработки пьезокерамического биочипа, определяющего микроальбумин с использованием специфических антител. Микроальбуминурия считается предвестником заболеваний внутренних органов, в частности почек, может свидетельствовать о развитии сердечной недостаточности и поражении сосудов. Таким образом, показатель микроальбумина в моче является важным фактором, определяющим общее состояние организма пациента [4].

Для исследования использовались два вида пьезокерамических дисков (рис.1): круглые одиночные пьезокерамические пластинки диаметром 16 мм и толщиной 0,1 мм и сдвоенные диски, состоящие из двух пьезокерамических пластинок диаметром 4 мм и толщиной 0,1 мм каждая. Пластинки диаметром 4 мм вырезались механическим способом из пластин большего размера и затем склеивались таким образом, чтобы направления их поляризации были разными. К электродам пластинок припаивались соединительные провода: по два провода для дисков первого вида и по три для дисков второго вида.

В эксперименте мы использовали шесть дисков диаметром 16 мм и три сдвоенных диска диаметром 4 мм. На все диски с помощью напылительной установки Q300T D (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) был нанесен слой золота толщиной 40 нм. Сразу после нанесения золота по три сдвоенных диска диаметром 4 мм и одинарных диска диаметром 16 мм были помещены в раствор 4-аминофенола в этиловом спирте с концентрацией 0,16 г/л (набор № 1), а потом три диска диаметром 16 мм (набор № 2) были помещены в этиловый спирт на шесть дней при комнатной температуре.

Применялись мышиные моноклональные антитела ("Иммунотех", Россия) к сывороточному альбумину человека (H-C15, "Биалекса", Россия). На набор дисков № 1 после модификации

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University.

² Центр перспективных технологий / Advanced Technologies Center.

поверхности аминотиофенолом наносили анти-тела в растворе EDC (1-этил-3-[3-диметиламино-пропил] карбодиimid гидрохлорида) для ковалентного связывания карбоксильной группы иммuno-глобулинов с аминогруппой на поверхности носите-ля. На диски диаметром 16 мм наносили анти-тела с EDC в количестве 29 мкл с концентрациями 5, 50 и 100 мкг/мл, на сдвоенные диски диаметром 4 мм - по 5 мкл с такой же концентрацией, после чего их оставляли на 12 ч при температуре -4°C.

Второй набор дисков помещали на 12 ч в раствор цистамина (меркаптоэтиламина) с концентрацией 0,05 М. Затем на каждый пьезокерамический диск наносили раствор антител с EDC в объеме 29 мкл с концентрациями 5, 50 и 100 мкг/мл.

Диски из первого набора диаметром 16 мм объединили со вторым набором, после чего детектировали иммобилизованные антитела с использованием коньюгата антител козы против антител мыши, меченных пероксидазой хрена. Инкубацию проводили в буфере PBST (фосфатный буферный раствор с твином 20), при детекции ферментативной активности пероксидазы использовали субстрат тетраметилбензидина (ТМВ).

По результатам проведенного измерения методом ИФА было показано, что для модификации поверхности носителя лучше использовать аминотиофенол, чем цистамин (рис.2).

Параллельно с ИФА проводился эксперимент с пьезокерамическими дисками диаметром 4 мм (набор № 1). Сдвоенные диски с концентрацией антител 50 мкг/мл помещались в проточную систему биосенсора [5]. Для измерения шумов в PBST-буфере



Рис.1. Пьезокерамические диски с нанесенным слоем золота. Слева – диски диаметром 4 мм, справа – диски диаметром 16 мм

Fig.1. Piezoceramic discs with layer of gold. 4 mm disks – on the left, 16 mm disks – on the right

определялась зависимость амплитуды колебаний диска от частоты в области резонансного пика. Измерения повторялись с интервалом в 1 с. После этого

The use of probe microscopy to detect biological macromolecules is a relatively new area. Earlier we presented methods for detecting viruses [1] and DNA [2, 3] using piezoceramic sensors. In particular, to detect the influenza A virus, a biosensor is proposed in which sialic acids that are capable of binding to the hemagglutinin of the virus envelope are used as bio-specific recognition reagents. For the detection of DNA, piezoceramic biochips can be used, on the surface of which oligonucleotide probes of known sequence

are immobilized. The principle of detection is based on the hybridization of these probes with complementary fragments of DNA molecules from the analyzed sample.

The aim of this work is to check the activity of antibodies on microalbumin for further development of piezoceramic biochip, which detects microalbumin using specific antibodies. Microalbuminuria is considered a harbinger of diseases of internal organs, in particular kidneys, and can indicate the development of heart failure

and vascular damage. Thus, the index of microalbumin in the urine is an important factor determining the general state of the patient's body [4].

For the study, two types of piezoceramic discs were used (Fig.1): round single piezoceramic plates with a diameter of 16 mm and a thickness of 0.1 mm and twin discs consisting of two piezoceramic plates with a diameter of 4 mm and a thickness of 0.1 mm each. Plates with a diameter of 4 mm were cut mechanically from plates of a larger size and then glued in such a way

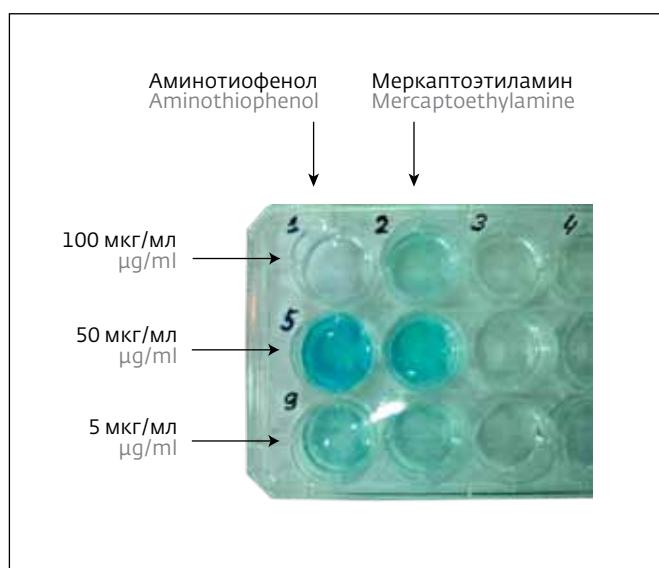


Рис.2. Результаты ИФА-анализа специфических антител, иммобилизованных на поверхности дисков. Наилучшее связывание происходило на поверхности диска, модифицированного аминотиофенолом, при концентрации антител 50 мкг/мл
Fig.2. Results of immunoenzymatic analysis of specific antibodies immobilized on surface of discs. Best binding occurred on surface of disk modified with aminothiophenol at antibody concentration of 50 µg/ml

для каждого измерения вычислялась резонансная частота методом определения центра масс. Поданным измерений строился график зависимости резонансной частоты пьезокерамического биочипа от времени (номера измерения – сканирования частоты) (рис.3).

that their polarization directions were different. Connecting wires were soldered to the electrodes of the plates: two wires for disks of the first type and three for disks of the second type.

In the experiment, we used six disks with a diameter of 16 mm and three twin discs with a diameter of 4 mm. All the disks were coated with a 40 nm thick gold layer using the Q300T D (Quorum Technologies Ltd., UK) deposition system. Immediately after the deposition of gold, three twin discs with a diameter of 4 mm and three single 16 mm discs (set No.1) were placed into a solution

of 4-aminothiophenol in ethyl alcohol with a concentration of 0.16 g/l, and then three 16 mm discs (set No.2) were placed into ethyl alcohol for six days at room temperature.

Mouse monoclonal antibodies (Immunotek, Russia) against human serum albumin (H-C15, Bialexa, Russia) were used. On the set of disks No.1, after modification of the surface with aminothiophenol, antibodies were applied in a solution of EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) for the covalent binding of the carboxyl group of immunoglobulins

На следующем этапе в буферный раствор был добавлен конъюгат антител козы против антител мыши, меченный пероксидазой. Отношение конъюгата к буферу составило 1:4 000 000. Эксперименты проводились при тех же условиях. На рис.4 приведены результаты для пьезокерамического диска диаметром 4 мм с концентрацией антител 50 мкг/мл.

При сравнении результатов измерений разных концентраций специфических антител к альбумину (50 и 5 мкг/мл) выявлено, что при снижении концентрации антител, иммобилизованных на пьезокерамическом диске, уменьшается диапазон изменения значений резонансной частоты, что подтверждает результаты, полученные методом ИФА (рис.2). Отсутствие результата при избыточной концентрации специфических антител (100 мкг/мл), нанесенных на пьезокерамические диски, объясняется тем, что на поверхности образуется несколько монослоев, которые связываются друг с другом за свободные фрагменты. Из-за этого добавленный в систему конъюгат практически не связывается с антителами и не вносит вклад в изменение резонансной частоты. Такой же вывод подтвердил ИФА-анализ.

Таким образом, разработана методика ковалентной иммобилизации специфических антител на поверхности пьезокерамических биочипов. В дальнейшем биосенсоры могут быть использованы для идентификации микроальбумина. Концентрация микроальбумина в пробе будет определяться по сдвигу резонансной частоты. Полученные данные свидетельствуют

to the amino group on the carrier surface. Antibodies with EDC in an amount of 29 µl with concentrations of 5, 50 and 100 µg/ml were applied to 16 mm discs, and 5 µl of the same concentration were placed on twin 4 mm discs, after which they were left for 12 hours at -4°C.

The second set of disks was placed for 12 hours into a solution of cysteamine (mercaptopropylamine) at a concentration of 0.05 M. Then, a solution of antibodies with EDC in a volume of 29 µl with concentrations of 5, 50 and 100 µg/ml was applied to each piezoceramic disk.

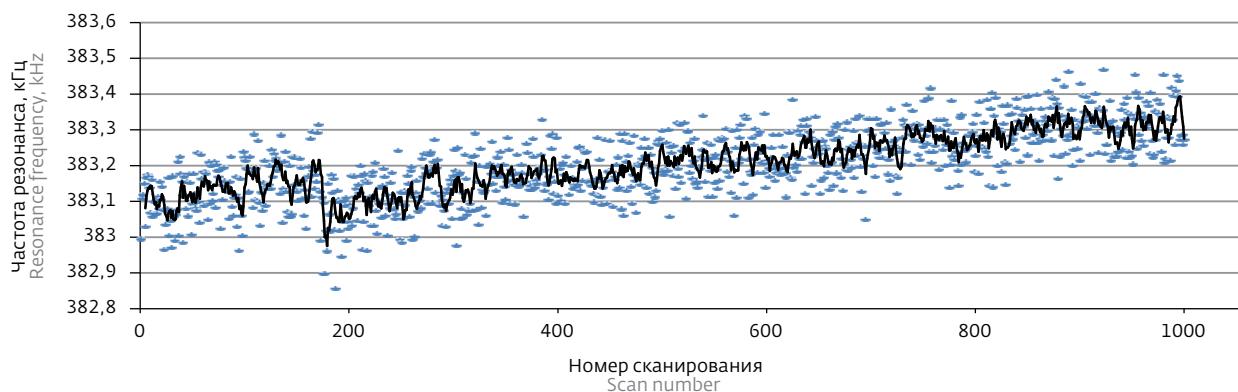


Рис.3. Контрольное измерение отклика биосенсора в буфере PBST. За 1000 с среднее значение резонансной частоты сместилось на 0,3 кГц

Fig.3. Benchmark measurement of biosensor response in PBST buffer. For 1000 seconds average value of resonant frequency has shifted by 0.3 kHz

о возможности применения пьезокерамического биосенсора для обнаружения белковых биомакромолекул.

Следует заметить, что существенное увеличение чувствительности пьезокерамического кантилеверного биосенсора можно будет получить при выборе оптимальной геометрии биочипа. Уменьшение геометрических размеров биочипа до микронных размеров позволит многократно повысить чувствительность метода. Технологически реализуемы следующие размеры биочипа: диаметр – 50–100 мкм, толщина – 5–10 мкм.

ЛИТЕРАТУРА

- Ахметова А., Гутник Н., Мешков Г. и др. Биосенсор для обнаружения вирусов и бактерий в жидкостях // НАНОИНДУСТРИЯ. 2016. Т. 70. № 8. С. 22–27.
- Дубровин Е.В., Преснова Г.В., Рубцова М.Ю. и др. Применение атомно-силовой микроскопии для 3D-анализа результатов гибридизации нуклеиновых кислот на микрочипах // Acta naturae. 2015. Т. 7. С. 117–124.
- Дубровин Е.В., Преснова Г.В., Рубцова М.Ю. и др. Раннее обнаружение инфекционных

16 mm disks from the first set were combined with a second set, after which immobilized antibodies were detected using a conjugate of goat antibodies against mouse antibodies marked by horseradish peroxidase. The incubation was carried out in PBST buffer (phosphate buffer solution with Tween-20), the substrate of tetramethylbenzidine (TMB) was used to detect the enzymatic activity of peroxidase.

Based on the results of the immunoenzyme analysis, it was shown that aminothiophenol is better suited for modifying the

carrier surface than cysteamine (Fig.2).

In parallel with immunoenzyme analysis, an experiment was performed with 4 mm piezoceramic discs (set No.1). Twin discs with an antibody concentration of 50 µg/ml were placed in the biosensor flow system [5]. To measure the noise in the PBST buffer, the dependence of the oscillation amplitude of the disk on frequency in the region of the resonance peak was determined. The measurements were repeated at intervals of 1 second. After that, for each measurement, the resonant frequency was calculated

by the method of determining the center of mass. According to the measurements, a graph of the resonance frequency of the piezoceramic biochip was plotted against time (measurement number – frequency scan) (Fig.3).

In the next step, a conjugate of goat antibodies against mouse antibodies marked with peroxidase was added to the buffer solution. The ratio of the conjugate to the buffer was 1 : 4,000,000. The experiments were carried out under the same conditions. Fig.4 shows the results for a 4 mm piezoceramic disc with an antibody concentration of 50 µg/ml.

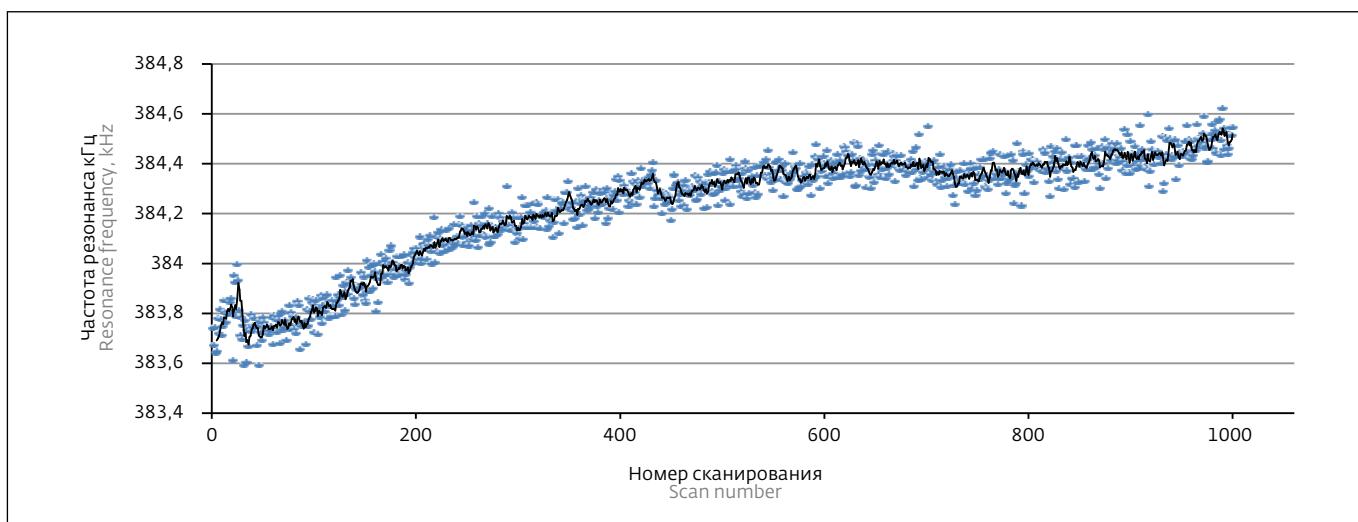


Рис.4. Кривая связывания конъюгата антител козы против антител мыши с иммобилизованными антителами на поверхности биочипа. Пьезокерамический диск (подложка золото + аминотиофенол + антитела H-C15 к альбумину) помещен в проточную ячейку (момент времени – 50 с). В объем буфера PBST 0,75 мл добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1 000 000. За 1000 с сдвиг по частоте составил 0,8 кГц

Fig.4. Binding curve of conjugate of goat antibodies against mouse antibodies with immobilized antibodies on biochip surface. Piezoceramic disk (substrate of gold + aminothiophenol + H-C15 antibodies to albumin) was placed into flow cell (time point of 50 sec.). 0.25 ml of conjugate with buffer (ratio of 1:1,000,000) was added to 0.75 ml of PBST buffer. For 1000 seconds, the frequency shift was 0.8 kHz

- заболеваний методом атомно-силовой микроскопии с использованием ДНК-микрочипов // Медицина и высокие технологии. 2015. № 3. С. 34–37.
4. Морозов Ю.А., Марченко Т.В., Исаева А.М. Микроальбуминурия: патофизиологические аспекты и лабораторные методы определе-

Comparing the results of measurements of different concentrations of specific antibodies to albumin (50 µg/ml and 5 µg/ml) it was found that when the concentration of antibodies immobilized on a piezoceramic disk decreases, the range of the resonance frequency changes decreases, which confirms the results obtained by immunoenzyme analysis (Fig.2). The lack of result at excess concentration of specific antibodies (100 µg/ml) deposited on piezoceramic discs is explained by the fact that several monolayers are formed on the surface, which bind to each other by free

fragments. Because of this, the conjugate added to the system practically does not bind to the antibodies and does not contribute to the change in the resonant frequency. The same conclusion was confirmed by the immunoenzyme analysis.

Thus, a technique has been developed for the covalent immobilization of specific antibodies on the surface of piezoceramic biochips. In the future, biosensors can be used to identify microalbumin. The concentration of microalbumin in the sample will be determined by the shift of the resonant

ния // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2012. № 4. С. 30–35.

5. Яминский И.В., Ахметова А.И., Мешков Г.Б. Физические методы обнаружения вирусов и бактерий с использованием инструментов сканирующей зондовой микроскопии // НАНОИНДУСТРИЯ. 2017. Т. 3. № 73. С. 56–59.

frequency. The obtained data testify to the possibility of applying a piezoceramic biosensor for the detection of protein biomacromolecules.

It should be noted that a significant increase in the sensitivity of the piezoceramic cantilever biosensor can be obtained by choosing the optimal geometry of the biochip. Reducing the geometric dimensions of the biochip to micron sizes will greatly improve the sensitivity of the method. The following dimensions of the biochip are technologically feasible: diameter of 50–100 microns, thickness of 5–10 microns. ■