



Получено: 25.03.2024 г. | Принято: 30.03.2024 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.3-4.220.229>

Научная статья

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ БЕЗ ПРИВИЛЕГИЙ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫХ И СТАНДАРТНЫХ НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАН В ИММУНОАНАЛИЗЕ НА МЕЛАТОНИН

С.В.Замалутдинова¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0009-0006-9510-1868 / podgorodova.sofya@yandex.ru
 П.А.Петрова¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0009-0004-7933-0594
 А.А.Рамонова¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-3081-4721
 Д.В.Багров¹, к.ф.-м.н., вед. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-6355-7282

Аннотация. Электроформование позволяет создавать полимерные мембранные, состоящие из нановолокон. Эти мембранные находят применение в различных задачах фильтрации, изготовления раневых покрытий и тканеинженерных конструкций, а кроме того, их рассматривают как перспективные подложки для иммуноанализа. Несмотря на активный интерес научного сообщества к применению электроформованных мембранных для иммуноанализа, на настоящий момент не проведено их прямого сопоставления с мембранными, сформированными с помощью других технологий. В данной работе мы провели такое сопоставление и показали, что детекция мелатонина методом иммуноферментного анализа происходит практически одинаково на мембранных, изготовленных методом электроформования, и обычных коммерчески доступных мембранных.

Ключевые слова: нитроцеллюлозные мембранные, иммуноанализ, мелатонин, иммуноферментный анализ

Для цитирования: С.В. Замалутдинова, П.А. Петрова, А.А. Рамонова, Д.В. Багров. Оригинальность без привилегий: сравнительный анализ электроформованных и стандартных нитроцеллюлозных мембранных в иммуноанализе на мелатонин. НАНОИНДУСТРИЯ. 2024. Т. 17, № 3–4. С. 220–229. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.3-4.220.229>

Received: 25.03.2024 | Accepted: 30.03.2024 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.3-4.220.229>

Original paper

ORIGINALITY WITHOUT PRIVILEGE: COMPARATIVE ANALYSIS OF ELECTROFORMED AND STANDARD NITROCELLULOSE MEMBRANES IN MELATONIN IMMUNOASSAYS

S.V.Zamalutdinova¹, Junior Researcher, ORCID: 0009-0006-9510-1868 / podgorodova.sofya@yandex.ru
 P.A.Petrova¹, Junior Researcher, ORCID: 0009-0004-7933-0594
 A.A.Ramonova¹, Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-3081-4721
 D.V.Bagrov¹, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Lead Researcher, ORCID: 0000-0002-6355-7282

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Biological Department, Moscow, Russia



Abstract. Electrospinning enables manufacturing of polymer membranes composed of nanofibres. These membranes find application as filters, wound coatings, and tissue engineering scaffolds. They are also considered promising substrates for immunoassays. Despite the scientific community's keen interest in the immunoassays based on electrospun membranes, a direct comparison with membranes formed through alternative technologies has not been conducted to date. In this study, we performed such a comparison and demonstrated that the detection of melatonin via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is virtually identical on the electrospun membranes and the conventional commercially available membranes.

Keywords: nitrocellulose membranes, immunoassay, melatonin, enzyme immunoassay

For citation: S.V. Zamalutdinova, P.A. Petrova, A.A. Ramonova, D.V. Bagrov. Originality without privilege: comparative analysis of electroformed and standard nitrocellulose membranes in melatonin immunoassays. NANOINDUSTRY. 2024. Vol. 17. No. 3-4. PP. 220-229. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.3-4.220.229>.

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноанализ является неотъемлемой частью клинической лабораторной диагностики и научных исследований. В его основе лежит специфическое взаимодействие между антигеном и антителом; константа диссоциации этого взаимодействия обычно лежит в диапазоне ~0,1-1 нМ [1]. Любая молекула из пары "антigen-антитело" может быть аналитом – при измерении уровня антител в крови их улавливают с помощью антигенов, а для обнаружения антигенов, наоборот, их улавливают с помощью антител.

Развитие нанотехнологий позволило значительно усовершенствовать многие виды иммуноанализа. Например, в лабораторную практику вошли наночастицы, модифицированные антителами [2], и аффинные биосенсоры, созданные с использованием нанотехнологий [3]. Были разработаны уникальные рекордно чувствительные иммуноаналитические системы на основе кремниевых "наноколодцев", способные зарегистрировать аналит в концентрации ~0,1 фМ [4]. В целом, наноматериалы стали неотъемлемым компонентом многих иммуноаналитических систем и позволили выполнять анализы быстрее, точнее и дешевле. На этом фоне особый интерес представляет использование электроформированных мембран в качестве подложек для иммуносенсоров.

Электроформированные мембранны – это полимерные нетканые материалы, состоящие из волокон субмикронного диаметра. Большинство коммерчески доступных нетканых материалов, изготовленных с помощью традиционных подходов, состоят из волокон с диаметрами порядка ~1-100 мкм, а для электроформированных мембран диаметры волокон лежат в диапазоне ~100 нм – 1 мкм, а иногда ~10 нм [5]. Малый диаметр волокон обеспечивает мемbrane

INTRODUCTION

Immunoassay is an integral part of clinical laboratory diagnosis and research. It is based on the specific interaction between antigen and antibody; the dissociation constant of this interaction is usually in the range of ~0,1-1 nM [1]. Any molecule from an antigen-antibody pair can be an analyte - when measuring antibody levels in the blood, they are captured by antigens, and conversely, to detect antigens, they are captured by antibodies.

The nanotechnology development has significantly improved many types of immunoassays. For example, antibody-modified nanoparticles [2] and affinity biosensors created using nanotechnology [3] have entered laboratory practice. Unique record-sensitive immunoanalytical systems based on silicon "nanowell" capable of registering an analyte at a concentration of ~0.1 fM have been developed [4]. In general, nanomaterials have become an integral component of many immunoanalytical systems and have enabled faster, more accurate and cheaper analyses. Based in this background, the use of electroformed membranes as substrates for immunosensors is of particular interest.

Electroformed membranes are polymeric nonwovens consisting of submicron diameter fibres. Most commercially available nonwovens fabricated using conventional approaches consist of fibres with diameters on the order of ~1-100 μm, while for electroformed membranes, fibre diameters are in the range of ~100 nm – 1 μm and sometimes ~10 nm [5]. The small fibre diameter provides the membrane with a high specific surface area (~10 m²/g) and ability to immobilise a large number of receptor layer molecules that will bind the analyte from the sample [6]. A number of works claim that electroformed membranes can be used as a promising element in systems for dot-blotting and similar laboratory analyses. For example, this has been demonstrated in experiments with Dengue virus - it is usually detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and detection limit can be reduced by about 10 times if the reaction is carried out on the of electroformed membrane

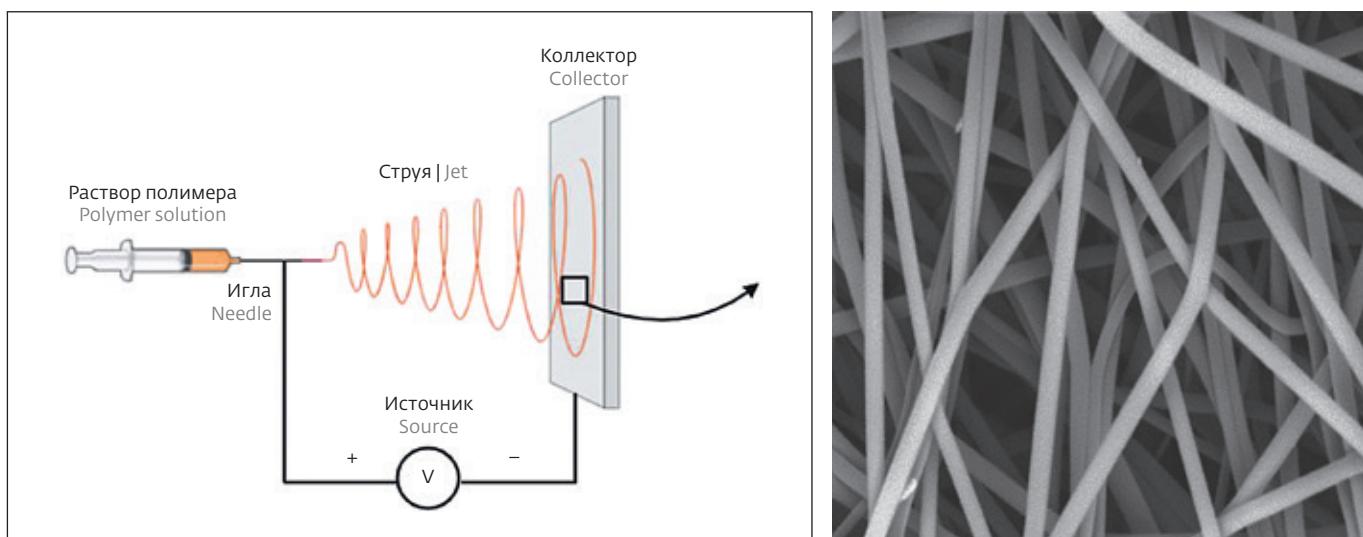


Рис.1. Схема электроформования (электротропнинга). Раствор полимера находится в шприце, игла которого расположена напротив проводящей пластины (коллектиора). Нановолокна формируются при испарении растворителя и затвердевании струи раствора полимера

Fig.1. Diagram of electroforming (electrospinning). The polymer solution is in a syringe, the needle is located in opposite to the conductive element, the collector. The nanofibres are formed by evaporation of the solvent and solidification of the polymer solution jet

высокую удельную поверхность ($-10 \text{ м}^2/\text{г}$) и возможность иммобилизовать большое количество молекул рецепторного слоя, которые будут связывать анализ из пробы [6]. Ряд работ утверждает, что электроформованные мембранны могут использоваться как перспективный элемент в системах для дот-блоттинга и аналогичных лабораторных анализов. Например, это было продемонстрировано в экспериментах с вирусом Денге – его обычно обнаруживают методом иммуноферментного анализа (ИФА), и предел обнаружения может быть снижен приблизительно в 10 раз, если реакция проводится не на донышке полистирольного планшета, а на поверхности волокон электроформованной мембранны [7, 8].

В основе электроформования (электротропнинга) лежит идея о том, что струя раствора полимера становится тоньше, если на ней есть сильный электрический заряд. Действительно, отталкивание между одноименными близко расположенными участками струи приводит к ее растяжению и уменьшению ее диаметра. Лабораторное электроформование работает следующим образом (рис.1). Раствор полимера помещают в шприц и выдавливают через иглу, расположенную напротив проводящего элемента – коллектора. Между коллектором и иглой прикладывают высокое напряжение, порядка $\sim 10\text{--}40 \text{ кВ}$. Заряженная струя раствора полимера движется к коллектору, при этом она

fibres surface rather than on the bottom of a polystyrene plate [7, 8].

Electroforming (electrospinning) is based on the idea that a polymer solution jet becomes thinner if there is a strong electric charge on it. Indeed, repulsion between homonymous closely spaced regions of the jet causes it to stretch and reduce its diameter. Laboratory electroforming works as follows (Fig.1). The polymer solution is placed in a syringe and squeezed out through a needle located opposite the conductive element, the collector. A high voltage, on the order of $\sim 10\text{--}40 \text{ kV}$, is applied between the collector and the needle. The charged jet of polymer solution moves towards the collector, usually deforming and becoming thinner. The solvent evaporates – and a polymer fibre is formed, the diameter of which is several orders of magnitude smaller than the diameter of the syringe needle. The fibre is deposited chaotically on the collector, where the electroformed membrane is assembled.

The electroforming method was proposed in the middle of the XX century by Academician Petryanov-Sokolov, and it was used to produce air filters to remove aerosol particles from the air [9, 10]. At the beginning of the XXI century, interest in electroforming has increased dramatically, and this can apparently be attributed to two factors. Firstly, scanning electron microscopes have become widespread and are a necessary tool for controlling the structure of electroformed membranes and measuring fibre diameters. Secondly, tissue engineering emerged and it became clear that electroformed membranes made of biodegradable polymers could be used to



обычно деформируется и становится тоньше. Растворитель испаряется, и при этом формируется полимерное волокно, диаметр которого оказывается на несколько порядков меньше диаметра иглы шприца. Волокно хаотическим образом осаждается на коллектор, где и собирается электроформованная мембрана.

Метод электроформования был предложен в середине 20 века академиком Петряновым-Соколовым, и с его помощью производили воздушные фильтры для удаления аэрозольных частиц из воздуха [9, 10]. В начале 21 века интерес к электроформованию резко вырос, и это, по-видимому, можно связать с двумя факторами. Во-первых, широкое распространение получили сканирующие электронные микроскопы, которые являются необходимым инструментом для контроля структуры электроформованных мембран и измерения диаметров волокон. Во-вторых, возникла тканевая инженерия и стало ясно, что электроформованные мембранны, изготовленные из биоразлагаемых полимеров, могут использоваться, чтобы имитировать структуру внеклеточного матрикса [5]. Таким образом, технология электроформования была адаптирована для биологических задач, и на этом фоне возникла гипотеза о применимости изготовленных с ее помощью мембран в биосенсорах.

В недавнем обзоре [6] было показано, что электроформованные мембранны могут быть использованы в биологических и химических сенсорах, предназначенных для обнаружения широкого класса анализаторов – от ионов металлов и взрывчатых веществ до цельных вирусов и бактерий. Среди биологических сенсоров особое место занимают иммуносенсоры, в которых рецепторный слой иммобилизован на поверхности электроформованных волокон (с молекулами рецепторного слоя связывается анализатор). В некоторых случаях такие сенсоры позволяют радикально снизить время анализа. Например, с использованием сенсора на основе электроформованной мембранны, антитела против вируса MERS-CoV могут быть обнаружены менее, чем за 6 мин – это несравненно меньше, чем типичное время проведения ИФА (~8 ч) [11]. В основе такого радикального сокращения времени лежит идея о пропускании пробы через пористую мембрану, на которой происходит аффинное связывание анализатора. Аналогичное, хотя и не столь радикальное, сокращение времени анализа, иногда достигается при использовании дот-блоттинга [12, 13]. В этом методе в качестве подложки используют пористую нитроцеллюлозную

mimic the extracellular matrix structure [5]. Thus, the electroforming technology was adapted for biological applications, and against this background, the applicability of the membranes fabricated with its help in biosensors was hypothesised.

In a recent review [6] it was shown that electroformed membranes can be used in biological and chemical sensors designed for detection of a wide class of analytes - from metal ions and explosives to whole viruses and bacteria. Among biological sensors, a special place is occupied by immunosensors in which the receptor layer is immobilised on the electroformed fibres surface (analyte binds to the molecules of the receptor layer). In some cases, such sensors can drastically reduce analysis time. For example, using an electroformed membrane sensor, antibodies against MERS-CoV can be detected in less than 6 minutes, which is incomparably shorter than the typical ELISA time (~8 hours) [11]. This radical reduction in time is based on the idea of passing the sample through a porous membrane on which affinity binding of the analyte occurs. A similar, although not so drastic, reduction in analysis time is sometimes achieved using dot-blotting [12, 13]. In this method, a porous nitrocellulose membrane is used as a substrate, and most solutions and reagents are applied using a vacuum pump.

This raises the question: is it true that an electroformed membrane consisting of thin nanofibres has advantages over conventional, commercially available porous membranes? To answer this question, it is necessary to compare the results of ELISA performed on the two types of membranes, and they must be made of the same material. In order for the experiment to be most representative, it is necessary to use a membrane clamp with a vacuum pump, which is designed for dot-blotting. Such an experiment was performed with nitrocellulose (NC) membranes; a reagent kit for melatonin detection was used as the ELISA system. It was shown that the electroformed membrane and commercially available porous NC provided almost identical results, with similar sensitivity and dynamic range.

MATERIALS AND METHODS

Membranes. Two types of NC membranes were used in this work - commercially available, mass-produced Bio-rad membranes (number 1620115), and original, electro-formed membranes. They were fabricated as follows. The Bio-rad membrane was dissolved in acetone, dimethylformamide (DMFA) or a mixture thereof. The concentration of NC was 100 mg/ml. Electrospinning was carried out on a Nanofiber Electrospinning Unit (China) under the following conditions 38–40 kV voltage, 15 cm collector distance, 0.514 mm needle inner diameter (21g gauge), and 1 ml/h solution feed rate.

Scanning electron microscopy. For scanning electron microscopy (SEM) study, the samples were coated with a

мембрану, а большинство растворов и реагентов наносят с помощью вакуумного насоса.

В связи с этим возникает вопрос: верно ли, что электроформованная мембрана, состоящая из тонких нановолокон, обладает преимуществами перед обычными, серийно выпускаемыми пористыми мембранами? Для ответа на этот вопрос необходимо сравнить результаты ИФА, выполненного на мембранных двух типов, причем они должны быть изготовлены из одного и того же материала. Для того чтобы эксперимент был наиболее показательным, необходимо использовать зажим для мембран с вакуумным насосом, который предназначен для дот-блоттинга. Такой эксперимент был выполнен с мембранными из нитроцеллюлозы (НЦ); в качестве системы для ИФА был использован набор реагентов для обнаружения мелатонина. Было показано, что электроформованная мембрана и коммерчески доступная пористая НЦ обеспечивают практически идентичные результаты – одинаковые значения чувствительности и динамического диапазона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мембранны. В работе использовали два типа мембран из НЦ – коммерчески доступные, выпускаемые серийно мембранны Bio-rad (номер 1620115), и оригинальные, электроформованные. Их изготавливали следующим образом. Мембрану Bio-rad растворяли в ацетоне, диметилформамиде (ДМФА) или их смеси. Концентрация НЦ составляла 100 мг/мл. Электроформование проводили на установке Nanofiber Electrospinning Unit (Китай) при следующих условиях: напряжение 38–40 кВ, расстояние до коллектора 15 см, внутренний диаметр иглы 0,514 мм (калибр 21g), скорость подачи раствора 1 мл/ч.

Сканирующая электронная микроскопия. Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы покрывали тонким слоем золота с толщиной 20 нм с помощью распылителя Eiko IB3 (Япония). Структуру исследовали с помощью СЭМ TM3000 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения Fiji.

Иммуноанализ. Для определения КО мелатонина методом ИФА использовали коммерческий набор KSA908Gel1 компании Cloude-Clone Corp (USA). Реакции проводили в ячейках 96-луночного планшета или на поверхности НЦ мембранных. В обоих случаях анализ включал в себя ряд шагов, которые обычно используют при конкурентном ИФА (табл.1). После каждого шага

thin layer of gold with a thickness of 20 nm using an Eiko IB3 sputterer (Japan). The structure was examined using a TM3000 SEM (Hitachi, Japan) at an accelerating voltage of 15 kV. Images were processed using Fiji software.

Immunoassay. A commercial kit KSA908Gel1 from Cloude-Clone Corp (USA) was used to detect melatonin by ELISA. Reactions were performed in the cells of a 96-well plate or on the surface of NC membranes. In both cases, the assay involved a series of steps that are commonly used in competitive ELISA (Table 1). After each step, the surface on which the reactions were performed was washed.

The analysis is based on the idea that a special reagent, a biotinylated competitor, must be introduced into each solution under investigation. This is a conjugate of albumin with MT and biotin, and it competes with the MT contained in the test solution for binding to antibodies immobilised on the surface. The biotin in this conjugate allows it to be shown using standard reagents such as streptavidin with horseradish peroxidase and substrates for optical detection (colourimetric or chemiluminescent).

Three buffers were used for reagent dilution: phosphate-salt buffer (PBS, pH 7.4), phosphate-salt buffer with 0.075% Tween-20 (PBST), and proprietary buffer with pH 9.5 for antibody dilution (Coating buffer, Cloud-clone). Blocking buffer solution (Cloud-clone) was used to block non-specific binding sites. Between incubations, the solid carrier was washed in PBST buffer to remove unbound molecules.

In the case of experiments in a 96-well plate, all incubations were performed in a thermostat at 37 °C and shaking at 130 rpm. The contents of the wells were removed by decantation. In the final step of the assay, 90 µl of tetramethylbenzidine was added to each well as a substrate for horseradish peroxidase, incubated for 15 min, then the reaction was stopped by adding 50 µl of 0.5 M sulfuric acid. Optical density of the plate wells was measured on a Hidex Chameleon reader (UK) at a wavelength of 450 nm.

In the case of membrane assays, incubations were performed at room temperature without shaking. The contents of the wells were removed by drawing the liquid through the membrane using a pump. At the final stage, the results were visualised using Affinity ECL chemiluminescent substrate (ProteinAntibodies LLC, RF). Chemiluminescence intensity was measured on a ChemiDoc device (BioRad, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Membrane morphology. The electroforming method is applicable to a very wide class of polymers - polyolefins, polyamides, polyesters, and others. At the same time, the number of papers devoted to the electroforming of NCs is relatively small [14,15]. This seems particularly strange in view of the fact that it was in experiments with NCs that



Таблица 1. Основные шаги ИФА и использованные реагенты
Table 1. Basic steps of DMFA and reagents used

Реагент (буфер, использованный для его разведения) Reagent (buffer used for its dilution)	Объем (мкл) Volume (μ l)	Концентрация Concentration	Время Time	Количество отмывок Number of washings
Улавливающие антитела Coating buffer	100	0,83 мкг/мл μ g/ml	1ч h	1
Блокировочный раствор Blocking solution	200	–	1ч h	1
Калибровочный раствор, смешанный с биотинилированным конкурентом (PBS) Calibration solution mixed with biotinylated competitor (PBS)	50+50	0–250 пг/мл калибровочного раствора, 0,5 мкг/мл конкурента 0–250 pg/ml calibration solution, 0.5 μ g/ml competitor	1ч h	3
Стрептавидин-пероксидаза хрена (PBS) Streptavidin horseradish peroxidase (PBS)	100	–	30 мин min	5

поверхность, на которой проводились реакции, отмывали.

В основе анализа лежит идея о том, что в каждый исследуемый раствор необходимо внести специальный реагент – биотинилированный конкурент. Это конъюгат альбумина с МТ и биотином, и он конкурирует с содержащимся в исследуемом растворе МТ за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности. Биотин, входящий в состав этого конъюгата, позволяет проявить его с помощью стандартных реагентов, таких как стрептавидин с пероксидазой хрена и субстраты для оптической детекции (колориметрической или хемилюминесцентной).

Для разведения реагентов использовали три буфера: фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7.4), фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,075% Tween-20 (PBST), а также проприetaryный буфер с pH 9,5 для разведения антител (Coating buffer, Cloud-clone). Для блокировки неспецифических сайтов связывания использовали раствор Blocking buffer (Cloud-clone). Между инкубациями для удаления не связавшихся молекул твердый носитель отмывали в буфере PBST.

В случае экспериментов в 96-луночном планшете все инкубации проводили в термостате при 37 °C и покачивании с частотой 130 об/мин. Содержимое лунок удаляли декантацией. На заключительном этапе анализа в качестве субстрата пероксидазы хрена в каждую лунку вносили

the electroforming process was carried out for the first time [9, 10].

For this work, electroforming conditions were chosen to produce membranes consisting of fibres with an average diameter of 280 ± 60 nm (Fig.2a, b). This is generally close to the size of pore boundaries in commercially available membranes (Fig.2, c, d). Optimal results were achieved using a two-component solvent consisting of a mixture of acetone and DMFA in a ratio of 7:3 or 8:2 by volume. A similar approach was used in [16]. When attempting to electroform NC from a solution in acetone, the syringe needle quickly clogged, and we failed to obtain a nonwoven membrane, although such experiments are described in [14, 15]. When using a solution of NC in DMFA, a different problem arose: DMFA has a relatively high boiling point of 153 °C and belongs to non-volatile solvents, it did not evaporate quickly enough, and a continuous film was formed on the collector. As a result, it turned out that the two-component solvent was optimal and allowed to obtain thin NC fibres.

Membranes of the two types described (Fig.2) were used in dot-blotting experiments.

Immunoassay results. To evaluate applicability of electroformed membranes in dot-blotting, it is necessary to select an analyte and a set of biochemical reagents for its detection. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, molecular weight 232 g/mol), a hormone that is responsible for regulating the sleep-wake cycle, was chosen as the analyte. Melatonin (MT) is usually measured using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS), which is the method used by clinical diagnostic laboratories in Russia. At the same time, there

по 90 мкл тетраметилбензидина, инкубировали 15 мин, затем реакцию останавливали внесением 50 мкл 0,5 М серной кислоты. Оптическую плотность содержимого лунок планшета измеряли на ридере Hidex Chameleon (Великобритания) при длине волны 450 нм.

В случае проведения анализа на мембранных инкубаций проводили при комнатной температуре без покачиваний. Содержимое лунок удаляли, протягивая жидкость через мембрану с помощью насоса. На заключительном этапе результаты визуализировали с помощью хемилюминесцентного субстрата Affinity ECL (ООО "БелкиАнтитела", Россия). Интенсивность хемилюминесценции измеряли на приборе ChemiDoc (BioRad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология мембранных. Метод электроформования применим к очень широкому классу полимеров – полиолефинам, полиамидам, полиефирам и др. При этом количество статей, посвященных электроформованию НЦ, относительно мало [14, 15]. Это представляется особенно странным с учетом того, что именно в экспериментах с НЦ процесс электроформования был осуществлен впервые [9, 10].

Для выполнения данной работы были выбраны условия электроформования, которые позволили создать мембранные, состоящие из волокон со средним диаметром 280 ± 60 нм (рис.2а, б). В целом это близко к размеру границ между порами в коммерчески доступных мембранных (рис.2с, д). Оптимальные результаты достигались при использовании двухкомпонентного растворителя, состоящего из смеси ацетона и ДМФА в соотношении 7:3 или 8:2 по объему. Аналогичный подход использовали в работе [16]. При попытке делать электроформование НЦ из раствора в ацетоне игла шприца быстро забивалась, и нам не удавалось получить нетканую мембрану, хотя такие эксперименты описаны в работах [14, 15]. При использовании раствора НЦ в ДМФА возникала иная проблема: ДМФА имеет сравнительно высокую температуру кипения 153 °C и относится к нелетучим растворителям, он недостаточно быстро испарялся, и на коллекторе формировалась сплошная пленка. В результате оказалось, что двухкомпонентный растворитель был оптимальным и позволил получить тонкие волокна из НЦ.

Мембранные двух описанных типов (рис.2) были использованы в экспериментах по дот-блоттингу.

Результаты иммуноанализа. Для оценки применимости электроформованных мембранных

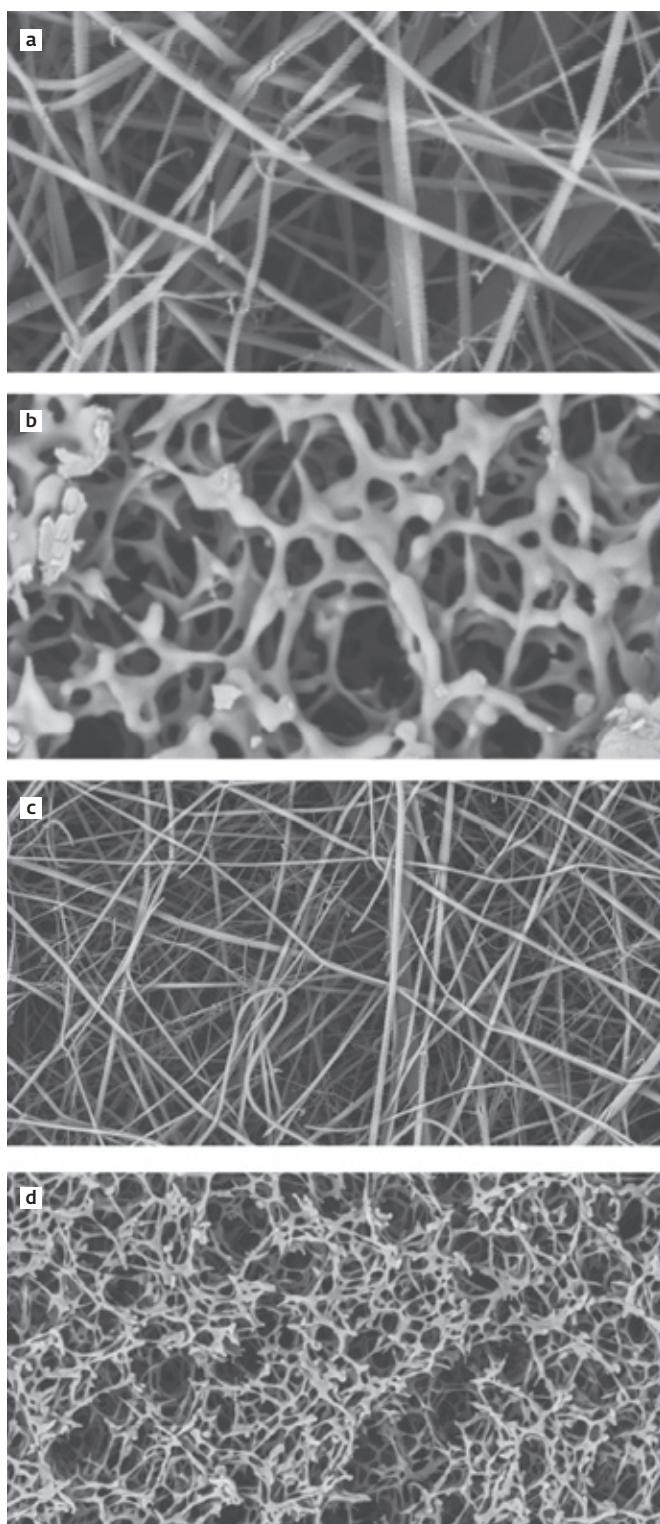


Рис.2. Изображения мембранных, полученные методом СЭМ. а, с – электроформованные мембранны; б, д – обычные мембранны. Масштабная метка равна 5 мкм (а, б) и 10 мкм (с, д)

Fig.2. Images of membranes obtained by SEM method. a, c – electroformed membranes; b, d – conventional membranes. The scale mark is 5 μm (a, b) and 10 μm (c, d)



в дот-блоттинге необходимо выбрать аналит и набор биохимических реагентов для его обнаружения. В качестве аналита был выбран мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин, молекулярная масса 232 г/моль) – гормон, который отвечает за регуляцию цикла сна и бодрствования. Обычно измерение мелатонина (МТ) проводят с помощью высокоеффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), именно этот метод используют клинико-диагностические лаборатории в России. В то же время существуют коммерчески доступные наборы для определения МТ методом ИФА. МТ является низкомолекулярным веществом, поэтому улавливающие антитела направлены не против него, а против его конъюгата с бычьим сывороточным альбумином, и этот же конъюгат используется в качестве стандарта. Анализ проводится конкурентным способом – в исследуемую пробу вносят биотинилированный конкурент, и МТ, находящийся в пробе, конкурирует с ним за связывание с антителами. Затем биотин можно детектировать конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена. Типичная калибровочная кривая такого анализа, полученная в обычном 96-луночном планшете, представлена на рис.3а – по мере увеличения концентрации МТ, сигнал снижается.

Реагенты из описанного набора были использованы для дот-блоттинга, с применением вакуумного зажима (рис.3б). Когда в нем размещена мембрана, он аналогичен 96-луночному планшету с проницаемым дном. Жидкость, внесенная в ячейки, не протекает через пористое дно спонтанно, так как ее задерживает сила поверхностного натяжения. Однако при включении насоса возникает перепад давления, который заставляет жидкость просачиваться сквозь мембрану и собираться в резервуар, расположенный под ней. Скорость протекания жидкости через мембрану зависит не только от перепада давления, созданного насосом, но и от расположения ячейки в пределах зажима. Вероятно, вблизи патрубка для подключения насоса перепад давления выше, чем вдали от него. Поэтому, чтобы сравнение двух типов мембран было корректно, их располагали в соседних рядах в центральной части зажима, причем ряд ячеек, закрытых электроформованной мембранный располагался между двумя рядами, закрытыми фабричной мембранный (рис.3б, д). Такое размещение мембран позволило свести к минимуму вариации условий нанесения реагентов и сосредоточиться на свойствах мембран.

are commercially available kits for determination of MT by ELISA. MT is a low molecular weight substance, so the capture antibodies are not directed against it, but against its conjugate with bovine serum albumin, and the same conjugate is used as a standard. The assay is performed in a competitive manner – a biotinylated competitor is introduced into the sample being assayed and the MT in the sample competes with it for binding to the antibody. Biotin can then be detected by conjugating streptavidin with horseradish peroxidase. A typical calibration curve of such an assay obtained in a conventional 96-well plate is shown in Fig.3a – as the concentration of MT increases, the signal decreases.

Reagents from the described kit were used for dot-blotting, using a vacuum clamp (Fig.3b). When a membrane is placed in it, it is similar to a 96-well plate with a permeable bottom. The liquid introduced into the cells does not flow through the porous bottom spontaneously because it is held back by the surface tension force. However, when the pump is switched on, a pressure differential occurs which causes the liquid to seep through the membrane and collect in a reservoir below it. The rate at which liquid flows through the membrane depends not only on the pressure drop created by the pump, but also on the location of the cell within the clamp. It is likely that the pressure drop is higher near the pump connection than away from it. Therefore, in order to compare the two types of membranes correctly, they were placed in adjacent rows in the central part of the clamp, with the row of cells covered by the electroformed membrane placed between the two rows covered by the fabricated membrane (Fig.3c, d). This arrangement of membranes allowed us to minimise variations in reagent application conditions and focus on membrane properties.

The calibration curves obtained with the conventional and electroformed membrane are compared in Fig.3c. These are decreasing curves similar to that obtained with the conventional ELISA (Fig.3a). The calibration curves obtained with the two types of membranes match well. We were unable to detect any obvious differences in sensitivity or in the width of the dynamic range. Apparently, in this case, the structure of nanofibres and the electrostatic charge present on them have little influence on the analysis results.

CONCLUSIONS

In this study, we performed a competitive ELISA for melatonin detection; the ELISA was performed in a dot-blotting variant using two types of nitrocellulose membranes, standard commercial and electroformed nanofibre membranes. It turned out that the membranes of these two types showed almost identical behaviour, with no obvious difference in sensitivity or dynamic range width. Nanostructured EF membranes may be of interest

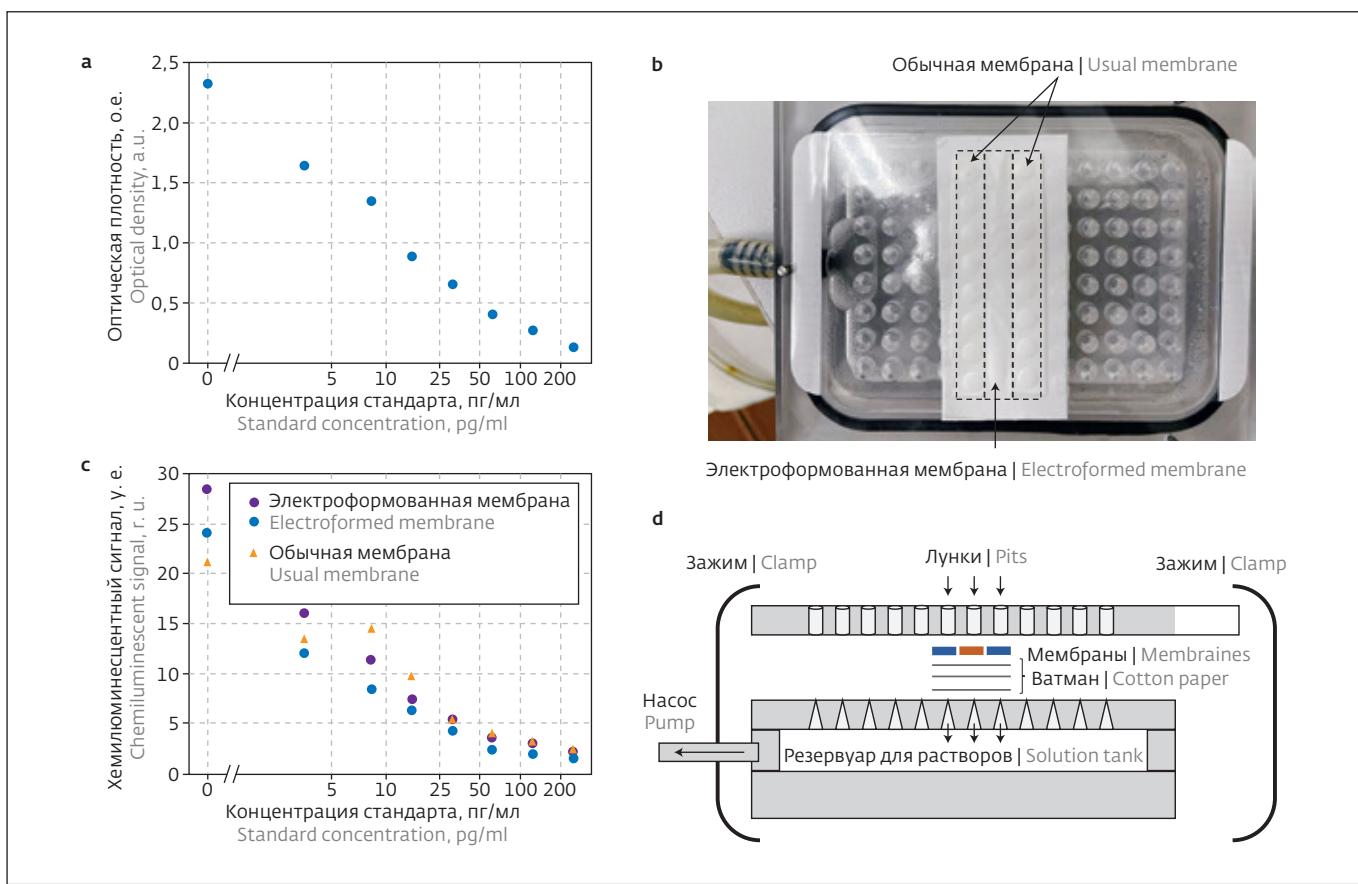


Рис.3. Результаты ИФА. а – калибровочная кривая ИФА на МТ, полученная в обычном планшете; использована колориметрическая детекция; б – схема вакуумного зажима для дот-блоттинга; в – калибровочные кривые ИФА на МТ, полученные при дот-блоттинге; использована хемилюминесцентная детекция; г – схема размещения мембран в зажиме

Fig.3. EFA results. a – EFA calibration curve for MT obtained in a conventional plate; colourimetric detection was used; b – schematic of the vacuum clamp for dot-blotting; c – calibration curves of ELISA on MT obtained by dot-blotting; chemiluminescent detection was used; d – scheme of membrane placement in the clamp

Калибровочные кривые, полученные с помощью обычной и электроформованной мембраны, сопоставлены на рис.3с. Это убывающие кривые, аналогичные той, которая получена при обычном ИФА (рис.3а). Калибровочные кривые, полученные с помощью мембран двух типов, хорошо совпадают. Нам не удалось выявить явных различий ни в чувствительности, ни в ширине динамического диапазона. По-видимому, в данном случае структура нановолокон и имеющийся на них электростатический заряд слабо влияют на результаты анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы провели конкурентный ИФА для детекции мелатонина; ИФА проводили в варианте дот-блоттинга с использованием нитроцеллюлозных мембран двух типов – стандартных коммерческих и электроформованных,

in other applications such as air purification or tissue engineering, but to our knowledge they have no clear advantage in immunoassays. The possibilities of improving the analytical performance of ELISA achieved by electroformed membranes require further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the grant of the Russian Science Foundation, project No. 21-74-10042.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



состоящих из нановолокон. Оказалось, что мембранны эти двух типов проявили себя практически одинаково, без явной разницы в чувствительности или ширине динамического диапазона. Наноструктурированные ЭФ-мембранны могут представлять интерес в других приложениях, например в очистке воздуха или тканевой инженерии, но по нашим данным они не имеют явных преимуществ в иммуноанализе. Возможности улучшения аналитических характеристик ИФА, достигаемые за счет электроформованных мембран, требуют дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РНФ, проект № 21-74-10042.

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kim B.B., Dikova E.B., Sheller U., Dikov M.M., Gavrilova E.M., Egorov A.M. Evaluation of dissociation constants of antigen-antibody complexes by ELISA. *Journal of Immunological Methods*. 1990. Vol. 131(2). PP. 213–222.
2. Hui L., Chen W., Najlah M. The challenges to develop antibody-conjugated nanomedicine products. *Nano TransMed*. 2023. Vol. 2(4). P. 100018.
3. Reimhult E., Höök F. Design of Surface Modifications for Nanoscale Sensor Applications. *Sensors*. 2015. Vol. 15(1). PP. 1635–1675.
4. Rissin D.M., Kan C.W., Campbell T.G., Howes S.C., Fournier D.R., Song L. et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010. Vol. 28(6). PP. 595–599.
5. Pavlova E.R., Bagrov D.V., Kopitsyna M.N., Shchelokov D.A., Bonartsev A.P., Zharkova I.I. et al. Poly(hydroxybutyrate co hydroxyvalerate) and bovine serum albumin blend prepared by electrospinning. *J of Applied Polymer Sci*. 2017. Vol. 134(29). P. 45090.
6. Pavlova E., Maslakova A., Prusakov K., Bagrov D. Optical sensors based on electrospun membranes principles, applications, and prospects for chemistry and biology. *New J Chem*. 2022. Vol. 46(18). PP. 8356–8380.
7. Hosseini S., Azari P., Aeinehvand M., Rothan H., Djordjevic I., Martinez-Chapa S. et al. Intrans ELISA: A Novel Approach to Fabrication of Electrospun Fiber Mat-Assisted Biosensor Platforms and Their Integration within Standard Analytical Well Plates. *Applied Sciences*. 2016. Vol. 6(11). P. 336.
8. Hosseini S., Azari P., Farahmand E., Gan S.N., Rothan H.A., Yusof R. et al. Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers: An exquisite outlook for fabrication of paper-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. Vol. 69. PP. 257–264.
9. Басманов П.И., Кириченко В.Н., Филатов Ю.Н., Юрлов Ю.Л. Высокоэффективная очистка газов от аэрозолей фильтрами Петрянова. М.: Наука, 2003. 272 с.
10. Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) / Под ред. Кириченко В.Н. М., 2001. 231 с.
11. Hoy C.F.O., Kushiro K., Yamaoka Y., Ryo A., Takai M. Rapid multiplex microfiber-based immunoassay for anti-MERS-CoV antibody detection. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2019. Vol. 26. P. 100304.
12. Ramachandran S., Singhal M., McKenzie K., Osborn J., Arjyal A., Dongol S. et al. A Rapid, Multiplexed, High-Throughput Flow-Through Membrane Immunoassay: A Convenient Alternative to ELISA. *Diagnostics*. 2013. Vol. 3(2). PP. 244–260.
13. Петрова П.А., Замалутдинова С.В., Внукова А.А., Алексеева Д.А., Багров Д.В. Обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде повышает чувствительность иммуноанализа. *Биофизика*. 2023. Vol. 68(3). PP. 435–441.
14. Nartker S., Drzal L.T. Electrospun Cellulose Nitrate Nanofibers. *J Nanosci Nanotech*. 2010. Vol. 10(9). PP. 5810–5813.
15. Manis A.E., Bowman J.R., Bowlin G.L., Simpson D.G. Electrospun nitrocellulose and nylon: Design and fabrication of novel high performance platforms for protein blotting applications. *J Biol Eng*. 2007. Vol. 1(1). P. 2.
16. Keaswejjareansuk W., Wang X.D. Sisson R., Liang J. Electrospinning process control for fiber-structured poly(Bisphenol A-co-Epichlorohydrin) membrane. *AIMS Materials Science*. 2020. Vol. 7(2). PP. 130–43.