

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

Шляпников Юрий Михайлович

**УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО И
ГИБРИДАЦИОННОГО АНАЛИЗА БИОМАКРОМОЛЕКУЛ С ПРИМЕНЕНИЕМ
МАГНИТНЫХ МЕТОК**

1.5.6. - Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
доктора химических наук

Москва – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	16
ГЛАВА 2. Ультрочувствительный иммуноанализ с электрофоретическим сбором аналитов на микрочипе для определения белковых биомаркеров в биологических образцах сложного состава	19
2.1. Мультиплексная тест-система для определения холерного токсина, стафилококковых токсинов А и В, термолабильного токсина <i>Escherichia coli</i> и токсина токсического шока	19
2.1.1. Материалы и методы исследования	21
2.1.2. Анализ биотоксинов в модельных системах и оценка перекрёстной реактивности	25
2.1.3. Обнаружение токсинов, добавленных к реальным образцам	29
2.1.4. Выводы к разделу 2.1.	31
2.2. Количественный ультрочувствительный иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками	32
2.2.1. Материалы и процедура титрования	32
2.2.2. Снижение вариации сигнала путем его нормировки на положительный контроль	32
2.2.3. Количественное определение фемтомолярных концентраций иммуноглобулинов	35
2.2.4. Специфичность анализа и пределы обнаружения туберкулезных антигенов ESAT-6 и PstS1	35
2.2.5. Определение содержания туберкулёз-специфического IgG в крови человека	36
2.2.6. Выводы к разделу 2.2.	39
2.3. Применение нейлоновых наночастиц для сбора микрокапель лёгочной жидкости из выдыхаемого воздуха	40
2.3.1. Расчет распределения размеров пор в наноматах различного типа	43
2.3.2. Механизм образования пор в наночастицах, полученных электропрядением с газофазной нейтрализацией	44
2.3.3. Выводы к разделу 2.3.	48
2.4. Использование ультрочувствительного иммуноанализа для бесконтактной диагностики туберкулёза по выдыхаемому воздуху	49
2.4.1. Характеристика больных с туберкулёзом и добровольцев, участвовавших в эксперименте	50
2.4.2. Проведение иммуноанализа и статистическая обработка данных	52

2.4.3. Тестирование образцов, взятых у пациентов и здоровых добровольцев	54
2.4.4. Выводы к разделу 2.4.	61
ГЛАВА 3. Разработка новых подходов для ультрачувствительного определения фрагментов ДНК	63
3.1. Изучение генерации активных форм кислорода при электродинамическом распылении	63
3.1.1. Методы определения содержания активных форм кислорода в продуктах электрораспыления	64
3.1.2. Определение выхода активных форм кислорода	66
3.1.3. Выводы к разделу 3.1.	69
3.2. Изучение механического повреждения молекул ДНК при электрораспылении	69
3.2.1. Материалы и методы исследования	70
3.2.2. Электрофорез продуктов электрораспыления ДНК фага λ	71
3.2.3. Зависимость повреждения молекул ДНК от различных факторов	73
3.2.4. Механизм повреждения молекул ДНК при электродинамическом распылении	81
3.2.5. Выводы к разделу 3.2.	84
3.3. Быстрый ультрачувствительный гибридационный анализ на микрочипах с применением магнитных меток	84
3.3.1. Материалы и методы исследования	86
3.3.2. Проведение гибридационного анализа и определение предела обнаружения одноцепочечных фрагментов ДНК	91
3.3.3. Детекция двухцепочечных фрагментов ДНК на микрочипах	97
3.3.4. Применение "активного" гибридационного анализа для мультиплексного определения <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> и <i>M. neoaurum</i> по специфическим ДНК-маркерам	104
3.3.5. Выводы к разделу 3.3.	105
ГЛАВА 4. Новые методы ультрачувствительного иммуноанализа без использования электрофореза, пригодные для широкомасштабного практического применения	107
4.1. Низкоадгезивный субстрат для микрочипов на основе плёнки из сшитой карбоксиметилцеллюлозы	
4.1.1. Методы исследования	108
4.1.2. Исследование неспецифической адгезии магнитных частиц к различным субстратам	115
4.1.3. Физико-химические характеристики плёнки из термически сшитой	

карбоксиметилцеллюлозы	118
4.1.4. Мультиплексный иммуноанализ с использованием микрочипов на основе плёнки из карбоксиметилцеллюлозы	123
4.1.5. Выводы к разделу 4.1.	127
4.2. Стратегия расщепляемого блокирования микрочипов для повышения эффективности иммуноанализа	127
4.2.1. Материалы и методы исследования	129
4.2.2. Изготовление и определение характеристик микрочипов с расщепляемым покрытием	133
4.2.3. Снижение фона в иммунофлуоресцентном анализе на микрочипах с расщепляемым покрытием	136
4.2.4. Повышение скорости массопереноса на микрочипах с расщепляемым покрытием	141
4.2.5. Иммуноанализ на целые вирусные частицы	145
4.2.6. Выводы к разделу 4.2.	147
4.3. Применение ультрачувствительного иммуноанализа для детекции раково-сетчаточных антигенов в моче больных раком почки, мочевого пузыря и предстательной железы	147
4.3.1. Материалы и методы исследования	151
4.3.2. Мультиплексная тест-система для определения раково-сетчаточных антигенов	155
4.3.3. Исследование образцов больных почечно-клеточным раком	157
4.3.4. Диагностическая эффективность раково-сетчаточных антигенов при раке мочевого пузыря и предстательной железы	166
4.3.5. Выводы к разделу 4.3.	173
ГЛАВА 5. Новые форматы электрофоретического разделения и концентрирования белков с их применением в ультрачувствительном иммуноанализе	175
5.1. Проточная ячейка для электрофоретического сбора аналита на магнитных частицах	175
5.1.1. Конструкция электрофоретической ячейки с магнитным концентратором	176
5.1.2. Определение предела обнаружения стафилококкового токсина А в тест-системе с электрофоретическим сбором на магнитных частицах	177
5.2. Конический электрофоретический концентратор для заряженных биомолекул	178
5.2.1. Распределение электростатического потенциала в конической электрофоретической ячейке	179
5.2.2. Электрохимические эффекты, связанные с поляризацией мембраны	184

5.2.3. Сбор белков на активированных магнитных частицах	188
5.2.4. Выводы к разделу 5.2.	190
5.3. Быстрый ультрачувствительный иммуноблоттинг с фотохимической иммобилизацией белков и магнитными метками	190
5.3.1. Методы исследования	192
5.3.1.1. Конструкция устройства для электрофореза	192
5.3.1.2. Сглаживание диализной мембраны	193
5.3.1.3. Измерение электрофоретической подвижности и коэффициента диффузии	194
5.3.1.4. Определение эффективности иммобилизации белка на целлюлозной мембране	194
5.3.1.5. Определение чувствительности детекции IL-1 β в традиционном дот-блоте	195
5.3.2. Быстрый сверхчувствительный дот-блот	196
5.3.2.1. Проведение электрофореза белков в зазоре между гидрофильными мембранами без геля	201
5.3.2.2. Определение электрофоретической подвижности белков в зазоре между мембранами	204
5.3.2.3. Предел обнаружения IL-1 β	208
5.3.2.4. Сравнение чувствительности различных методов детекции сигнала	209
5.3.2.5. Определение биомаркеров туберкулеза в выдыхаемом воздухе	211
5.3.2.6. Быстрый метод иммуноблоттинга для определения фемтограммовых количеств белка методом “push-pull”	213
5.3.3. Выводы к разделу 5.3.	217
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	218
ВЫВОДЫ	219
Список литературы	221
Основные публикации по теме диссертации	247
Благодарности	249

Список сокращений:

АПТЭС – 3-аминопропилтриэтоксисилан
АСМ – атомно-силовая микроскопия
АФК – активные формы кислорода
БСА – бычий сывороточный альбумин
КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза
КОЕ – колониеобразующая единица
МЧ – суперпарамагнитные частицы
ПВП – поливинилпирролидон
ПВС – поливиниловый спирт
ПрО – предел обнаружения
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ПЭИ – полиэтиленимин
П.о. – пар оснований
СО – стандартное отклонение
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат
ЭП - электропрядение
ЭР – электрораспыление

АUC – площадь под кривой
ССА – кумарин-3-карбоновая кислота
CDI – 1,1'- карбонилдиимидазол
CDR – процедура циклического «стекания-восполнения»
CHAPS – 3-(3-холамидопропил) диметиламмоний-1-пропансульфонат
СТ – холерный токсин
Cyt C – цитохром с
DMAC – диметилацетамид
EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид
h-Hb – гемоглобин человека
NEPES – (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)
h-IgG – антитела IgG человека
HCCA – 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты
IL-1 β – интерлейкин-1 β

m-IgG - антитела IgG мыши

LT – термолабильный токсин

M. tuberculosis, Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

MES – 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота

NHS – N-гидроксисукцинимид

Ova – овальбумин

PBS – стандартный фосфатный буфер

SA – стрептавидин

SDS – додецилсульфат натрия

SEA – энтеротоксин А

SEB – энтеротоксин В

TAPS – [трис(гидроксиметил)метиламино] пропансульфоновая кислота

TNBT – тетранитро синий тетразолий хлорид

TSST – токсин синдрома токсического шока

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Развитие быстрых ультрачувствительных методов определения возбудителей инфекционных заболеваний и биотоксинов в объектах окружающей среды и продуктах питания, а также детекция различных биомаркеров в биологических образцах в диагностических целях является одной из самых востребованных и динамично развивающихся областей прикладной биотехнологии.

Особое место в медицинской биотехнологии занимает разработка новых тест-систем и производство диагностикумов для экспресс-анализа значительного количества образцов. Новые ультрачувствительные и быстрые методы открывают возможность обследования больших групп населения, имеющих повышенный риск заражения, для ранней диагностики таких социально значимых заболеваний, как туберкулёз. Это особенно важно в связи с наблюдающимся ухудшением эпидемиологической и экологической ситуации в мире. В основе большинства широко используемых методик определения белковых антигенов лежит иммуноферментный анализ (ИФА), чувствительность которого ограничена наномолярными концентрациями аналитов. Тем не менее медицина нуждается в развитии более чувствительных технологий для решения стоящих перед ней новых задач, например, неинвазивной диагностики бактериальных и вирусных заболеваний по анализу выдыхаемого воздуха; улучшение качества клинических испытаний лекарственных средств; выявление некоторых заболеваний, таких как нейродегенеративные. Во многих случаях концентрации и количество биомаркеров столь низки, что традиционные методы иммуноанализа неспособны их выявить.

В последние десятилетия ведутся также интенсивные исследования, направленные на диагностику онкологических заболеваний по специфическим биомаркерам, содержащимся в биологических жидкостях и тканях. До сих пор точная постановка диагноза рака требует высокоинвазивных процедур, тогда как неинвазивные подходы по-прежнему представляют собой серьёзный вызов. Отсутствие значительного прогресса в этой области также указывает на необходимость рассмотрения принципиально новых концепций, например, введения в практику более чувствительных методов анализа, способных детектировать новые онкомаркеры, присутствующие в биологических образцах в ультранизких концентрациях. Очевидно, что решение каждой такой прикладной задачи требует определённого сочетания характеристик предлагаемого метода (чувствительность, специфичность, экспрессность анализа, экономичность).

Разработка высокочувствительных и в то же время простых и рентабельных способов проведения иммуноанализа или иммуноблотинга представляет также интерес для исследователей, которые в своей научной работе сталкиваются с проблемой выявления следовых количеств белка в образцах сложного состава. Таким образом, дальнейшее развитие новых инструментальных

способов ультрачувствительной детекции биомакромолекул является крайне актуальной задачей практической биотехнологии.

В случае анализа реальных биологических образцов сложного состава задача заключается в обнаружении следовых количеств аналита в присутствии большого избытка различных интерферирующих веществ. Для этого требуется высокая специфичность анализа, которую трудно достичь методами, основанными на амплификации сигнала, которые практически всегда сопровождаются возрастанием фона. Помимо недостаточной чувствительности, ограничением традиционного иммуноанализа является его продолжительность (до нескольких часов), которая определяется кинетикой массопереноса аналита к поверхности. Так возник интерес к технологиям, которые позволили обойти диффузионные ограничения и сократить время анализа.

В литературе описаны многочисленные инновации для повышения чувствительности традиционных методов анализа биомакромолекул. К ним относятся разные методы амплификации зонда и сигнала, использование новых наночастиц-маркеров, детектируемых в ультранизких концентрациях, цифровой ИФА, цифровая ПЦР и многие другие. И прогресс в этой области очевиден. Однако серийно производимые приборы, основанные на технологии регистрации единичных молекул, в реальных приложениях используются пока только в специализированных клинических и исследовательских учреждениях, прежде всего, из-за высокой стоимости и сложности оборудования.

По сравнению с традиционными биоаналитическими методами, перспективность применения микрочипов и магнитных частиц для детекции сигнала обусловлена такими преимуществами как высокая чувствительность, скорость и экономичность анализа. Магнитные метки могут выявлять единичные молекулы аналита, связанные на микрочипе, а детекция самих частиц осуществляется по их светорассеянию в оптическом микроскопе с темнопольным осветителем. Такой экономичный подход позволяет анализировать сложные по составу смеси без или с минимальной пробоподготовкой, обеспечивая уникально высокую специфичность за счёт силовой дискриминации специфических и неспецифических взаимодействий действием контролируемой гидродинамической силы. Однако для проведения такого гетерофазного анализа требуются низкоадгезивные по отношению к магнитным меткам подложки, а также новые эффективные способы снижения фонового сигнала.

В целом, автором настоящей работы за последние годы разработан комплекс новых подходов и оригинальных решений, и есть все основания полагать, что внедрение систем нового типа в практическую биотехнологию позволит расширить возможности рентабельных методов иммунохимического и гибридного анализа биомакромолекул.

Степень разработанности темы исследования. На момент начала работы в литературе имелись отдельные примеры анализа биомакромолекул с фемтомолярной чувствительностью, основанные на разных методологиях. Высокая чувствительность достигалась в основном за счёт различных способов амплификации сигнала или благодаря применению дорогостоящих высокочувствительных детекторов. Особо следует выделить методы анализа белков и ДНК с помощью магнитных частиц, основанные на силовой дискриминации межмолекулярных взаимодействий под действием гидродинамической силы. Большой вклад в это направление внёс д.ф.-м.н. В.Н. Морозов, и настоящее исследование является логическим продолжением и развитием его идей. К началу работы не существовало в достаточной степени универсального набора методов без амплификации сигнала, основанных на этой технологии. Не был описан метод количественного измерения концентрации аналита на микрочипах с помощью магнитных меток. Не было показано практического применения такой технологии для неинвазивной диагностики таких заболеваний, как туберкулёз лёгких и рак. Никогда ранее для сбора и дальнейшего анализа биомаркеров, содержащихся в выдыхаемом воздухе, не использовались наночипы, изготовленные по простой и надёжной технологии. Не было проведено систематического исследования механизма разрыва молекул ДНК при электрораспылении, используемого для изготовления микрочипов. Применение метода силовой дискриминации было ограничено использованием микрочипов, в то время как другие форматы гетерофазного анализа, такие как иммуноблот, оставались без внимания.

Цели и задачи исследования. Цель работы заключалась в разработке направления, связанного с созданием универсального набора аналитических методов и тест-систем на основе микрочипов с применением магнитных меток для высокочувствительного определения биомакромолекул в образцах сложного состава, и в развитии подходов для повышения эффективности твердофазного иммуноанализа.

Для достижения поставленной цели потребовалось решить следующие задачи:

1. В целях создания сенсорных систем для ультрачувствительного анализа биомакромолекул разработать подходы, позволяющие проводить количественный мультиплексный иммуноанализ на микрочипах с электрофоретическим концентрированием аналитов. Продемонстрировать применение разработанных методов и тест-систем для определения биотоксинов и биомаркеров различных заболеваний в реальных образцах сложного состава без предварительной (или с минимальной) пробоподготовки.
2. Изучить возможность неинвазивной диагностики туберкулеза лёгких по специфическим биомаркерам, содержащимся в выдыхаемых наночастицах лёгочной жидкости.

3. Разработать методологию проведения ультрачувствительного и мультиплексного экспресс-анализа фрагментов ДНК на микрочипах. Изучить процесс повреждения молекул ДНК при электрораспылении и определить пригодность метода для производства ДНК-микрочипов.
4. Предложить новую стратегию для ускорения массопереноса аналита и снижения фонового сигнала в иммуноанализе на микрочипах за счет расщепляемого покрытия. Получить новые низкоадгезивные подложки для микрочипов на твёрдой основе для использования в автоматических анализаторах.
5. Разработать новые форматы электрофоретического разделения и концентрирования белков. Апробировать аналитические возможности новых устройств в анализе биологических объектов сложного состава, содержащих ультранизкие концентрации аналитов, в том числе, выдыхаемого воздуха.
6. Изучить возможность использования ультрачувствительного иммуноанализа для поиска новых биомаркеров онкологических заболеваний.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- Проведено систематическое исследование способов повышения аналитических характеристик (чувствительность, мультиплексность, точность анализа) в ультрачувствительном иммуноанализе с электрофоретическим сбором аналитов на микрочипах.
- Показано, что наночастицы, изготовленные методом электрораспыления с газофазной нейтрализацией, имеют калиброванные поры и пригодны для сбора образцов выдыхаемого воздуха и последующего их анализа с целью диагностики инфекционных заболеваний.
- Разработан принципиально новый метод гибридизационного экспресс-анализа на микрочипах с электрофоретическим концентрированием фрагментов ДНК с ультравысокой чувствительностью (предел обнаружения 0,1 фМ).
- Изучен механизм повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении.
- В результате целенаправленного подбора полимеров разработана новая низкоадгезивная подложка из термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы для изготовления микрочипов.
- Предложена новая концепция химически расщепляемой защитной блокировки поверхности микрочипов. Применение этой технологии позволяет управлять смачиваемостью поверхности и, в результате, снизить фоновый сигнал и повысить скорость массопереноса аналитов.
- Предложен подход для создания оригинальных электрофоретических устройств, позволяющих концентрировать белки в десятки тысяч раз за несколько минут.
- Разработана оригинальная схема проведения иммуноблоттинга, предполагающая формат электрофоретического разделения аналитов в зазоре между мембранами без геля.

Теоретическая значимость работы заключается в следующем:

- Установленный механизм повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении предполагает разрыв в ускоряющемся потоке вблизи поверхности конуса Тейлора. Метод нагружения полимерных цепей со скоростями, которые нельзя достичь другими экспериментальными способами, может стать основой для изучения молекулярной механики ДНК.
- С применением теории Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека (ДЛФО) рассчитан интервал значений ионной силы среды, обеспечивающих как низкую неспецифическую адгезию магнитных частиц к сильно заряженной поверхности карбоксиметилцеллюлозы, так и возможность установления специфических межмолекулярных взаимодействий в области контакта между поверхностями.

Практическая значимость работы заключается в следующем:

- Разработаны тест-система и методика ультрачувствительного мультиплексного определения биотоксинов в продуктах питания и воде из различных источников без предварительной (или минимальной) пробоподготовки без использования дорогостоящего оборудования.
- Для неинвазивной диагностики лёгочной формы туберкулёза по выдыхаемому воздуху разработана тест-система и способ проведения иммуноанализа образцов с применением наночипов собственного изготовления.
- Разработаны методики модификации поверхности мембраны из целлюлозы для изготовления ДНК-микрочипов.
- Новый способ гибридизационного анализа фрагментов ДНК на микрочипах с чувствительностью 10000 копий за 5 минут позволяет одновременно обнаружить десятки различных патогенных микроорганизмов.
- Показано, что с помощью более чувствительных, чем традиционные, методов иммуноанализа можно открыть новые онкомаркеры, присутствующие в биологических жидкостях в ультранизких концентрациях.
- Разработаны электрофоретические устройства, позволяющие концентрировать белки в $10^4 - 10^5$ раз за 10 - 15 минут.
- Уникальные аналитические характеристики метода иммуноблоттинга без переноса на мембрану с пределом обнаружения 0,3 фг (10-20 зептомоль) белка за 5 минут открывают новые перспективы его применения в молекулярно-биологических исследованиях.

Методология и методы исследования. Общая стратегия исследования направлена на развитие экономичных ультрачувствительных методов анализа биомолекул с апробацией на примере реальных биологических систем. Выбор разрабатываемых тест-систем обусловлен их

востребованностью для решения практических задач, связанных с медицинской биотехнологией. Основой предложенной методологии является использование микрочипов и магнитных меток на стадии детекции сигнала. Для изготовления микрочипов применяли метод электродинамического распыления белков и олигонуклеотидов. Для формирования на поверхности подложек и магнитных частиц необходимых функциональных групп использовали классические методы химической модификации. Фрагменты ДНК получали энзиматическим расщеплением, разделение фрагментов проводили с использованием электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Электрофорез также применяли при проведении иммунохимического и гибридизационного анализа на микрочипах, для разделения аналитов в иммуноблоте, для концентрирования аналитов в конической ячейке. На стадии детекции сигнала магнитными метками использовали метод гидродинамического потока. Анализ поверхности подложек для микрочипов, определение размера волокон в наночастицах, а также изучение действия конденсирующих агентов на молекулы ДНК, осуществляли методом атомно-силовой микроскопии. Растворы белков и фрагментов ДНК перед электрораспылением диализовали против воды. Образцы мясного экстракта обессоливали гелефильтрацией. Концентрации белков и нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически или взвешиванием с помощью кварцевого резонатора. Для сравнения эффективности различных способов анализа белков использовали иммуноферментный анализ, а также Вестерн-блот с хемилюминесцентной детекцией сигнала. Иммунофлуоресцентный анализ проводили с помощью флуоресцентных методов.

Положения, выносимые на защиту:

- Трехстадийная методика проведения мультиплексного гетерофазного иммуноанализа и разработанная тест-система позволяют одновременно выявлять пять бактериальных токсинов с пределом обнаружения до 0.1 пг/мл (1фМ) при времени анализа не более 10 минут в образцах сложного состава без предварительной (или минимальной) подготовки проб. Ошибку измерения концентрации при определении фемтограммовых количеств аналита можно значительно уменьшить за счет введения внутренней нормировки сигнала.
- Ультрочувствительный иммуноанализ на микрочипах с применением магнитных меток позволяет проводить бесконтактную диагностику туберкулёза лёгких по специфическим биомаркерам, содержащимся в собранных на фильтрах пробах выдыхаемого больным воздуха. Наночастицы из нейлона, изготовленные методом электрораспыления с газовой фазой, обладают высокой фильтрующей способностью за счёт образования калиброванных пор.
- Новый способ мультиплексного ультрочувствительного гибридизационного анализа фрагментов ДНК на микрочипах с использованием магнитных меток позволяет достичь предела обнаружения

0,1 фМ и сократить время анализа до 5 минут. Установлено, что механизм повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении связан с их гидродинамическим разрывом в ускоряющемся потоке вблизи поверхности конуса Тейлора.

- Новая низкоадгезивное покрытие для микрочипов на стеклянной основе из термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы обеспечивает эффективную детекцию сигнала магнитными метками. Такие микрочипы могут быть использованы в автоматических анализаторах.

- Блокирование поверхности микрочипов химически расщепляемым блокирующим агентом, содержащим перфторацильную группу, позволяет повысить эффективность иммуноанализа за счет улучшения массопереноса аналитов из объема к поверхности микрочипа и уменьшения фонового сигнала, обеспечивая тридцатикратное повышение соотношения сигнал/шум.

- Использование ультрачувствительного иммуноанализа позволяет найти новые мочевые онкомаркеры. Раково-сетчаточные антигены аррестин и рековерин являются перспективными предиктивными биомаркерами онкоурологических заболеваний.

- Разработанные оригинальные электрофоретические устройства на основе полупроницаемой мембраны позволяют за 15 минут сконцентрировать белки до 10^5 раз.

- Метод ультрачувствительного иммуоблоттинга, включающий электрофоретическое разделение образца в зазоре между соприкасающимися мембранами, фотохимическую *in situ* иммобилизацию белков и их детекцию магнитными частицами, покрытыми специфическими антителами, позволяет обнаружить до 0,3 фг (10-20 зептомоль) белка за 5 минут.

Личный вклад диссертанта. Вся экспериментальная работа по изготовлению микрочипов и анализу биологических объектов выполнена лично автором диссертации. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, разработке конкретных устройств, платформ и методик, анализе полученных результатов. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит автору диссертации, причем доля его участия в научных трудах [с1-с6, с8, с17] составляет не менее 4/5. В работах по разработке концентрирующей ячейки [с12] и тест-систем [с11,с13-с15] доля участия автора составляет больше 3/5. Автором была проведена основная работа при подготовке полученных результатов к публикации, а также представление большинства работ в редакции журналов и переписка с рецензентами. При этом необходимо отметить следующее. Раково-сетчаточные антигены и антитела были получены в лаборатории проф. А.А. Замятина (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова), сбор образцов крови и мочи больных проводили сотрудники Института урологии и репродуктивного здоровья человека Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова [публикации с2, с13, с14]. Образцы выдыхаемого воздуха собраны сотрудниками ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» [с15]. Антитела к стафилококковым токсинам были

получены в лаборатории акад. Е.В. Гришина (ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук) [с11].

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса современных методов исследования, статистической оценки погрешности измерений, а также высокой воспроизводимостью полученных данных. Эксперименты проводили более чем в трех повторах, для анализа результатов использовали адекватные и современные методы статистической обработки.

Результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: VII и VIII Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013, 2015), V Съезде биофизиков России (г. Ростов-на-Дону, 2015), 19, 20 и 24 Международных школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015, 2016, 2020), Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2018), XXXI зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и нанобиотехнологии» (Москва, 2019), VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019), Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020), конференциях «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пушино, 2017, 2018, 2020, 2021, 2022, 2023), XXI Конгрессе Российского общества урологов (Санкт-Петербург, 2021), 41 Конгрессе Международного общества урологов (Дубай, 2021), VII Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2022), XVII Международном Конгрессе Российского общества онкоурологов (Санкт-Петербург, 2022), II Евразийском Конгрессе урологов (Уфа, 2023).

Публикации. Все результаты по материалам диссертационной работы опубликованы в 17 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus (12 - в журналах 1 квартиля, 4 – в журналах 2 квартиля, 1 – в журнале 3 квартиля), и 3-х патентах.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена в рамках государственного задания 2010-2022 г.г., в рамках Федеральной целевой программы «Национальная технологическая база» (шифр “Токсивир”), проекта Фонда Сколково «Инноград-Пушино», гранта РФФИ офиМ № 15-29-01180, гранта РНФ №15-15-00086, в котором соискатель являлся основным исполнителем и гранта РНФ №19-75-10025, в котором соискатель являлся руководителем проекта.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, краткого литературного обзора и 4-х глав, каждая из которых содержит литературную и постановочную части, обсуждение результатов и промежуточные выводы, заключения, выводов и списка цитируемых источников из 391 наименования. Диссертационная работа изложена на 249 страницах, включая 27 таблиц, 106 рисунков и схем.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В последние годы наблюдается устойчивая тенденция к увеличению количества публикаций, связанных с разработкой новых разнообразных подходов и аналитических систем для снижения предела обнаружения (ПрО) биомолекул. Это объясняется, в первую очередь, востребованностью новых высокочувствительных тест-систем со стороны клиницистов, так как измерение ультранизких количеств различных биомаркеров, вирусов, патогенных микроорганизмов остаётся серьезной проблемой во многих диагностических приложениях. В тематических статьях и обзорах [например, 1-7] отражены последние достижения в этой области. Ввиду того, что настоящая работа носит комплексный характер и включает исследования, относящиеся к разным, в достаточной степени независимым друг от друга, направлениям, общий анализ литературных данных, охватывающих всю работу в целом, выглядел бы фрагментарным и сложным для восприятия. Более логичным и информативным представляется детальный разбор публикаций, посвящённых узкому кругу научных проблем, в соответствующих главах диссертации. Здесь будут представлены только некоторые наиболее интересные и успешные разработки и обозначены основные проблемы в области ультрачувствительных методов анализа биомолекул.

Если речь идет об ультрачувствительном анализе белков с концентрацией ниже 1 пг/мл в сложных по составу смесях, традиционные методы без усиления сигнала и без предварительного концентрирования образцов оказываются непригодными из-за недостаточной чувствительности. Эффективность биоаналитических систем можно значительно повысить за счёт использования разнообразных способов амплификации сигнала, а с применением высокочувствительных детекторов и цифрового ИФА обнаруживать практически единичные белковые молекулы (10 молекул в 200 мкл образца [3]). Для сильно разбавленных растворов аналитов можно применить преконцентрирование, однако при наличии в системе значительных концентраций интерферирующих соединений, эта процедура имеет смысл только при очень высокой специфичности метода детекции. Анализ литературных данных показывает, что в последнее время усилия исследователей направлены в основном на поиск новых схем амплификации мишени или сигнала. Из высокочувствительных методов определения белков отметим только некоторые, близкие по теме работы: магнитометрию [8], поверхностно-усиленную рамановскую спектроскопию с использованием различных по химической природе и составу частиц - золотых, магнитных, кремниевых, углеродных и др. [9], цифровой ИФА [7]. Приведём некоторые примеры. Чувствительность определения фактора некроза опухоли в слюне, полученная с помощью электрохимического иммуносенсора с магнитными частицами, составила 0,3 пг/мл [8]. Иммунохроматографический анализ с детекцией сигнала методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии позволил снизить ПрО стафилококкового энтеротоксина SEB до 1 пг/мл

[10]. К новаторским методическим решениям можно отнести объединение на одной платформе электрофоретического разделения компонентов и каскадного усиления сигнала: аналитическая чувствительность определения гамма-интерферона составила 1,6 фМ [5]. Из большого количества различных модификаций традиционного ИФА следует особо отметить цифровой ИФА [6, 11, 12]. Основные достижения метода описаны в недавно опубликованном обзоре [3]. К примеру, используя «амплификацию по катящемуся кругу», удалось повысить чувствительность определения провоспалительного цитокина IL-1 β до 99,6 аМ [6]. Однако в настоящее время применение коммерческих вариантов цифрового обнаружения белков (например, Quanterix's Simoa) для диагностики *in vitro* ограничено, в первую очередь, из-за высокой стоимости. Одной из проблем метода остаётся низкая эффективность отбора проб для подсчёта целевых молекул. Дальнейший прогресс создатели метода связывают с привлечением микрофлюидных капельных систем [3].

В последние годы значительное развитие получила также технология иммуно-ПЦР, основанная первоначально на прямом методе ИФА. Современные модификации, включающие применение золотых частиц и различных способов комбинации иммуноанализа и ПЦР, позволили достичь субфемтомолярных значений предела обнаружения белков [13, 14]. Так, ПрО туберкулёзных антигенов ESAT-6 и PstS1, добавленных в образцы слюны здоровых добровольцев, составил 10 фг/мл [15].

Подводя итоги, можно констатировать, что прогресс в повышении чувствительности анализа биомакромолекул приближается фактически к своему пределу - возможности регистрации единичных молекул [16]. Однако эти технологии не получили, как можно было бы ожидать, широкого распространения в реальных приложениях, в том числе ввиду высокой сложности научной задачи и имеющихся технических проблем. Примечательно, что на этом фоне вновь возрастает интерес к развитию традиционных, может быть и уступающих в чувствительности, но экономичных биоаналитических методов, таких как иммунохроматография [17]. Рентабельные способы экспресс-анализа биомакромолекул, способных тем не менее выявлять ультранизкие концентрации аналитов, могут внести дополнительный вклад в решение ряда практически важных задач.

Привлечение технологии микрочипов для анализа биомакромолекул показало отличные результаты. Главное, они обеспечивают возможность проведения мультиплексного анализа десятков или даже сотен аналитов, их можно изготовить на различных поверхностях. Возможности применения микрочипов с детекцией сигнала магнитными метками для ультрачувствительного анализа белков и фрагментов ДНК детально разобраны в представленной работе.

В настоящее время разнообразные магнитные частицы размером от 3 нм до 3 мкм широко используются в различных приложениях: для магнитной сепарации клеток, при очистке ДНК, в магнитном концентрировании и анализе биомакромолекул. Их преимущества неоспоримы: они

удобны в использовании, чрезвычайно стабильны, в отличие от квантовых точек и флуоресцентных меток, их легко можно внедрить в состав полимерных матриц и/или модифицировать поверхность и иммобилизовать нужную репортёрную молекулу или частицу [18]. Кроме того, для их детекции чаще всего не требуется дорогостоящее оборудование. Из существенных недостатков, ограничивающих применение магнитных частиц, следует отметить их высокую неспецифическую адгезию, особенно на гидрофобных поверхностях.

На момент начала работы было известно об эффективности использования сил гидродинамического потока в анализе на микрочипах с применением магнитных частиц на стадии детекции сигнала: чувствительность обнаружения одноцепочечных молекул ДНК составила 0,1 пМ [19]. Впоследствии методика была значительно усовершенствована, но способ детекции не вышел за пределы первоначального формата [20]. В работах другой группы исследователей с помощью силовой дискриминации и простого подсчёта магнитных частиц на поверхности микрочипа в микрофлюидной ячейке удалось обнаружить фактор некроза опухоли в концентрации 1 фг/мл [21]. Однако, несмотря на такие очевидные успехи, эти работы не получили дальнейшего развития.

Эффективность сил гидродинамического потока и силовой дискриминации в гетерофазном анализе белков была независимо показана д.ф.-м.н. В.Н. Морозовым. Для преодоления диффузионных ограничений он предложил использовать электрофоретический сбор аналита на микрочипе непосредственно в проточной ячейке и сканирование поверхности магнитными метками со специфическими антителами при действии магнитного поля [22]. Была также продемонстрирована уникальная специфичность предложенной технологии [23]. Именно сочетание двух факторов - высокой специфичности и чувствительности анализа - привлекло наше внимание и послужило отправной точкой для данного исследования. Был поставлен вопрос: насколько можно усовершенствовать биоаналитическую систему с применением микрочипов и магнитных меток и каковы границы ее применимости. Помимо этого, в работе решалась задача разработки новых низкоадгезивных подложек для микрочипов, которые можно было бы использовать в автоматических анализаторах для выявления особо опасных инфекций в окружающей среде.

ГЛАВА 2. УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ СБОРОМ АНАЛИТОВ НА МИКРОЧИПЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ СЛОЖНОГО СОСТАВА

2.1. Мультиплексная тест-система для определения холерного токсина, стафилококковых токсинов А и В, термолабильного токсина *Escherichia coli* и токсина токсического шока

Во всем мире многочисленные эпидемические вспышки вызываются патогенами желудочно-кишечного тракта, которые могут находиться в воде или пище. Менее опасные, но более распространенные бактерии, такие как стафилококки и кишечная палочка, также могут вызывать всплеск кишечных заболеваний со многими пострадавшими. В то же время большую часть инфекционных вспышек можно предотвратить постоянным мониторингом потенциальных источников заражения. Хотя в большинстве случаев скорость анализа не является критической, существуют ситуации, когда экспресс-анализ оказывается чрезвычайно полезен. Одним из эффективных и распространенных способов обнаружения бактериальных патогенов является детекция биомаркеров - бактериальных токсинов, которые обычно представляют собой стабильные белки, секретируемые этими бактериями в больших количествах [24]. Значение LD₅₀ холерного токсина составляет у мышей 250 мкг/кг [24], но такие симптомы, как диарея, обнаруживаются при дозах на порядок меньше [25]. Летальные дозы энтеротоксинов стафилококка относительно высоки, однако уже 1 мкг токсина вызывает у человека сильную интоксикацию [26]. Очевидно, что для контроля пищевых продуктов и воды нужна мультиплексная тест-система, обладающая высокой чувствительностью, специфичностью, а также экспрессностью и экономичностью. Разработка такой аналитической системы для выявления пяти бактериальных токсинов: холерного токсина (СТ), продуцируемого *Vibrio cholerae*, термолабильного токсина *Escherichia coli* (LT) и трех токсинов золотистого стафилококка: энтеротоксинов А (SEA) и В (SEB) и синдрома токсического шока (TSST), стала целью данной части работы. Характеристики некоторых описанных в литературе тест-систем приведены в табл. 1. Как видно, за некоторыми исключениями, для большинства методов время анализа занимает более 1 ч, а предел обнаружения (PrO) лежит в диапазоне 0,1 - 10 нг/мл. Ультрочувствительные анализы, описанные для СТ [27, 28], стали возможны благодаря чрезвычайно сильному и специфическому взаимодействию СТ с его уникальным нативным лигандом - ганглиозидом GM [29]. Чрезвычайно высокая чувствительность была достигнута в случае обнаружения SEB в буфере с помощью анализа на микрочипах с силовой дискриминацией на стадии детекции сигнала магнитными частицами; однако предел обнаружения токсина в сыворотке крови повышался до

100 фг/мл [20]. К недостаткам метода можно отнести сложную, многоступенчатую обработку поверхности стекла при изготовлении микрочипов.

Таблица 1. Характеристика методов определения выбранных биотоксинов.

Метод	Одновременно выявляемые аналиты	Биотоксин	Предел обнаружения, нг/мл	Время анализа	Ссылки
Иммуноанализ на основе гидрогеля с моноклональными антителами	15	SEA	2,3	2 ч	30
		SEB	1,2		
		CT	0,5		
		LT	10		
Иммуноанализ на основе гидрогеля с моноклональными антителами	7	SEA	0,3	2 ч	31
		SEB	0,5		
Иммуноанализ на микрочипе с детекцией флуоресцентно-меченных наночастиц	3	SEB	0,1-0,01	> 3,5 ч	33
		CT			
ИФА с поликлональными антителами	1	TSST	0,01	3 ч	33
ИФА с моноклональными антителами	1	TSST	0,06	> 2 ч	34
Сэндвич-иммуноанализ с использованием квантовых точек	4	SEB	> 10	~ 2 ч	35
		CT			
Сэндвич-иммуноанализ с использованием флуоресцентно-меченных микросфер	6	SEB	0,064	2,5 ч	36
		CT	1,6		
Флуоресцентный биосенсор	6	SEB	≥ 0,5	24 мин	37
		CT			
Иммуноанализ с использованием флуоресцентно-меченных магнитных частиц	5	SEB	0,003	> 3,5 ч	38
Анализ с использованием микросфер с амплификацией сигнала	3	CT	0,004	1,5 ч	39
		SEB	0,1		
Микроанализ с моноклональными антителами	6	CT	26	> 1 ч	40
		SEB	412		

Пьезоэлектрический иммуносенсор	1	SEA	20	15 мин	41
Импедиметрический иммуносенсор	1	СТ	1	> 1 ч	42
Иммуноанализ с ганглиозид-липосомами	1	СТ	10^{-2} - 10^{-5}	20 мин	27
Электрохимический иммуносенсор с ганглиозид-липосомами	1	СТ	10^{-6}	> 1 ч	28
Анализ с использованием магнитных частиц и силовой дискриминации	1	SEB	10^{-6} (в буфере) 10^{-4} (в крови)	20 мин	20

В основу одновременного мультиплексного обнаружения бактериальных токсинов был положен «активный» способ проведения иммуноанализа, предложенный д.ф.-м.н. В.Н. Морозовым [22, 23, 43, 44]. Такое название отражает его основное достоинство - замену диффузии принудительным транспортом на всех этапах распознавания, что позволяет резко уменьшить как предел обнаружения, так и время анализа. В настоящей работе данная методика была дополнена и применена для проведения одновременного мультиплексного анализа, обладающего высокой специфичностью.

2.1.1. Материалы и методы исследования

Все реактивы были приобретены у Sigma-Aldrich. В работе использовали диализные мембраны из регенерированной целлюлозы (Fisherbrand, MWCO 12-14 кДа) фирмы Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Покрытые стрептавидином (SA) и карбоксилированные суперпарамагнитные частицы диаметром 1 мкм, Dynal MyOne получены из Invitrogen (Carlsbad, CA, США). Энтеротоксин А (SEA) и энтеротоксин В (SEB), термолабильный токсин Escherichia coli (LT) и токсин синдрома токсического шока (TSST) были любезно предоставлены профессором Ю.В. Вертиевым (НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России). Моноклональные антитела против СТ, SEA, SEB, LT и TSST были получены и охарактеризованы в лаборатории д.б.н. Ф.А. Бровко (ФИБХ РАН) и лаборатории акад. Е.В. Гришина (ИБХ РАН). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ. В работе использовали следующие буферные системы: 20 мМ имидазол, 10 мМ Gly, pH 8.5 (имидазол-глициновый буфер), имеющий низкую проводимость; 33 мМ пиридин, 3 мМ борная кислота, pH 8.0 (пиридин-боратный буфер), компоненты которого не реагируют с NHS-активированными карбоксилированными магнитными частицами. Биотинилированные антитела получали по методике, описанной в работе [45].

Первоначально тест-систему оценивали с использованием растворов биотоксинов в буфере А, который включал 0,5 мас. % ПВС, 0,5% ПВП, 0,1% Твин-20 и 20 мМ имидазола, который титровали до рН 9,3 твердым глицином. Значение рН выбирали так, чтобы в условиях анализа все токсины, имеющие рI 6,6 - 8,8, были заряжены отрицательно. Фарш говядины экстрагировали PBS (25 мл на 25 г мяса) при комнатной температуре в течение 10 мин. Смесь центрифугировали 10 мин при 500 g и водную фазу отбирали для анализа. Анализируемые вещества (водопроводная и речная вода, молоко и мясной экстракт), за исключением отрицательных контролей, предварительно смешивали с определённым количеством биотоксинов. Образцы коровьего молока (с содержанием жира 2,5 мас. %) центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g. Осадок и образовавшийся на поверхности слой жира отбрасывали. Молочные и мясные экстракты обессоливали гель-фильтрацией с центрифугированием в течение 10 мин при 500 g в колонке с сефадексом G-25 [46]. Обессоленную фракцию разбавляли 200 мМ имидазол-глициновым буфером с 5% ПВП и 0,5% Твин-20 и использовали для анализа. Для оценки содержания жира образцы экстрагировали хлороформом. Аликвоту органической фазы высушивали на кварцевом резонаторе для определения массы сухого остатка, как описано в работе [47]. Концентрацию белка в обезжиренных образцах определяли методом Брэдфорд [4829] с растворами БСА в качестве стандарта. Для получения МЧ с антителами суспензию 10^8 SA-меченных МЧ (10 мкл 1%-ной суспензии) в 300 мкл PBS с 1% БСА, 0,1% Твин-20 и 1 мкг биотинилированных антител, инкубировали при перемешивании в течение 30 мин. Затем добавляли 50 мкл 1 мМ водного раствора биотина и смесь инкубировали в течение 5 мин. Частицы промывали 5 раз 0,05 мас. % Твин-20 и хранили при 4 °С. Такая процедура применялась к каждому из биотинилированных антител.

Микрочипы изготавливали на активированной плазмой диализной мембране методом электрораспыления (ЭР) [23]. Для этого мембрану обрабатывали в радиочастотном плазменном разряде на воздухе в течение 15-20 с при 0,5 - 1 Торр для образования на поверхности альдегидных групп, образующих с молекулами белка основания Шиффа. Перед экспериментом белки диализовали в течение 10 ч против дистиллированной воды при 4 °С. Концентрацию белка определяли с помощью кварцевого резонатора. Затем к каждому раствору добавляли 10-кратный избыток (по массе) трегалозы и разбавляли водой до концентрации 0,2 мг/мл. В качестве маски при электрораспылительном осаждении белков использовали полиэфирную сетку (Miami Lakes, FL, USA), состоящую из 96 мкм-нитей с отверстиями 150 мкм. После осаждения первого белка сетку смещали относительно подложки с помощью ручного манипулятора и проводили распыление следующего белка. Зоны распылённых веществ размером 50 x 50 мкм² располагались с интервалом 246 мкм. Микрочип содержал девять зон: пять зон моноклональных антител против каждого токсина, три зоны СТ в качестве положительного контроля и зону овальбумина (Ova) в

качестве отрицательного контроля. После осаждения белков микрочип выдерживали в течение 1 ч в камере при 100% влажности при комнатной температуре. Оставшиеся реакционные группы блокировали раствором, содержащим 100 мМ этаноламина, 1% ПВС, 1% ПВП и 1% NaBH_4 , pH 8,5 [49]. Микрочипы хранили в 50 об. %-ном глицерине при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Конструкция проточной ячейки, использованной для иммуноанализа, приведена на рис. 1. Она состоит из трёх проточных каналов: канала (3) для раствора аналита и двух других (4) и (5) для электродных буферов. Для образования канала (3) фрагмент микрочипа размером $1,3 \times 15\text{ мм}^2$ (1) зажимали через прокладку (6) с другим отрезком диализной мембраны (2). Высота канала ~ 100 мкм, ширина - 1,2 мм. Другая сторона каждой мембраны была обращена в камеру, охлаждаемую потоком буфера и соединённую с платиновой проволокой (11, 12). Магнитное поле создавалось постоянным магнитом с коническим концентратором (13), размещённым под проточной ячейкой. Связывание магнитных меток в рабочих зонах микрочипа регистрировали с помощью малоомощного микроскопа с темнопольным осветителем (14). Помимо магнита, осветителя и расположенной над линзой (15) ПЗС-камеры (не показана на схеме), устройство включало источник питания, насос для охлаждения электродного буфера и два шприцевых насоса для образца и суспензии МЧ.

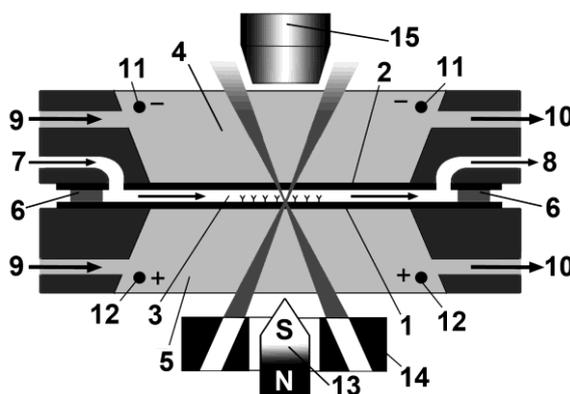


Рис. 1. Поперечное сечение проточной ячейки: 1) микрочип, 2) верхняя мембрана, 3) проточная ячейка, 4) камера верхнего электрода, 5) нижняя электродная камера, 6) прокладка кольцевого уплотнения, 7) суспензия магнитных частиц, 8) выход для аналита, 9, 10) вход и выход буфера для охлаждения, 11) отрицательный электрод, 12) положительный электрод, 13) магнитный концентратор, 14) темнопольный осветитель, 15) микроскопическая линза.

Схема методики анализа представлена на рис. 2. Образец прокачивали через проточную ячейку в течение 3 мин (стадия 1) при постоянном напряжении 100 - 150 В. Так как положительный электрод находится под микрочипом, отрицательно заряженные токсины при движении концентрируются на поверхности микрочипа. Ячейку охлаждали потоком электродного буфера со

скоростью 10 мл/мин, а напряжение выбирали так, чтобы выделяющаяся тепловая мощность не превышала 0,5 Вт. После прохождения образца смесь из пяти биотинилированных антител, содержащая по 0,2 мкг / мл каждого вида антител в буферном растворе Б, прокачивали через проточную ячейку в течение 2 мин со скоростью 40 мкл / мин при включённом напряжении и охлаждении ячейки, как описано выше (стадия 2). Буферный раствор Б содержал 0,5% ПВС, 0,5% ПВП, 0,1 мас. % Твин-20 и 20 мМ имидазол-глициновый буфер, рН 8,5. После выключения напряжения под проточную ячейку помещали магнит и через канал прокачивали суспензию МЧ, покрытых стрептавидином (SA), (0,001% в буфере А) со скоростью потока 8 - 12 мкл / мин в течение 2 мин (стадия 3). Таким образом, всю процедуру выполняли в одной проточной ячейке в три этапа, следующих один за другим с интервалом в несколько секунд. В общей сложности вся процедура занимала не более 7 мин. В другом, двухэтапном варианте, после электрофоретического сбора биотоксинов через проточную ячейку сразу прокачивали суспензию МЧ, меченных антителами. Из-за уменьшения количества шагов весь анализ может быть выполнен за 5 мин.

Изображения микрочипов получали с помощью USB-камеры DCM510 (SkopeTek, Китай). Каждое изображение разделяли на зоны, соответствующие определённым токсинам и контролям. Количество связанных магнитных частиц в каждой зоне определяли с помощью программного обеспечения собственной разработки, подсчитывающего яркие пятна определённого размера на тёмном фоне. Для тестирования программного обеспечения частицы также считали вручную и результаты сравнивали. Разница во всех случаях не превышала 5%. Для каждой зоны вычисляли средний сигнал (среднее количество частиц в зоне), а также его стандартное отклонение (СО).. Сигнал считали положительным, если отношение сигнал/шум, вычисляемое как (средний сигнал - отрицательный сигнал)/(СО отрицательного контроля) превышало 2,5, что соответствует уровню достоверности 0,99. Для оценки ПрО для каждого токсина были построены градуировочные графики зависимости значения сигнала от концентрации аналита и рассчитаны стандартные отклонения по данным 20 микрочипов. Предел обнаружения определяли с помощью градуировочного графика как минимальную концентрацию анализируемого вещества, дающую в анализе положительный сигнал, с учётом данного уровня достоверности.

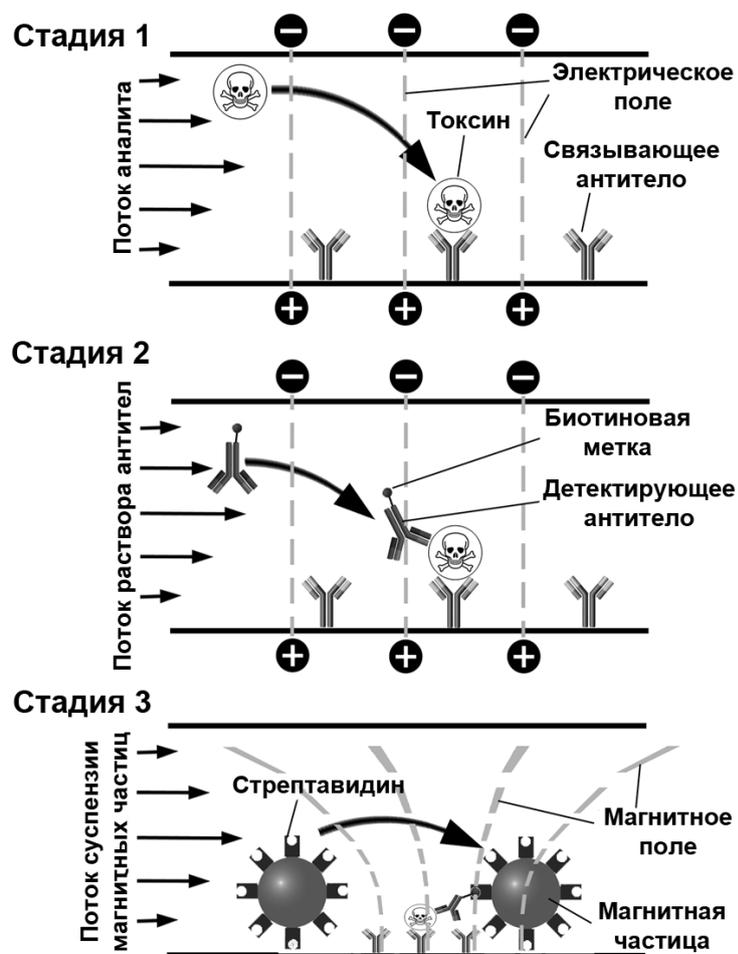


Рис. 2. Схематическое описание процедуры анализа. Стадия 1: электрофоретическое улавливание токсинов из потока на микрочипе. Стадия 2: активное электрофоретическое мечение связавшегося аналита с помощью биотинилированных вторичных антител. Стадия 3: визуализация биотиновых меток путем сканирования поверхности микрочипа покрытыми стрептавидином магнитными частицами в сдвиговом потоке и магнитном поле.

2.1.2. Анализ биотоксинов в модельных системах и оценка перекрёстной реактивности

В случае, когда вторичные антитела непосредственно связаны с магнитными частицами, проведение мультиплексного анализа значительно усложняется. Дело в том, что смешение частиц с различной функциональностью при сохранении одинаковой концентрации каждого сорта увеличивает общую концентрацию частиц, что может приводить к повышенной агрегации в магнитном поле внутри проточной ячейки [50, 51]. Сохранение одинаковой общей концентрации частиц в суспензии пяти видов частиц, покрытых различными антителами, требует уменьшения концентрации частиц для каждого вида в 5 раз. Чтобы сохранить уровень сигнала для каждого вида частиц, требуется увеличение времени сканирования в пять раз. При условии, что для одного

сорта частиц сигнал появляется через ~2 мин после начала сканирования, для одновременного анализа 5 различных аналитов потребуется 10 мин.

В другом подходе молекулы антител различной специфичности могут быть смешаны перед иммобилизацией. Очевидно, что меченные таким образом частицы будут связываться менее надежно из-за меньшего количества специфических антител в области контакта частицы с поверхностью. Чтобы избежать этих недостатков, в процедуру анализа была введена дополнительная «активная» стадия связывания вторичных антител, меченных биотином. Поскольку в этом случае нет никаких ограничений на общую концентрацию биотинилированных антител, «стоимость» мультиплексирования заключается в увеличении времени анализа на 2 мин, независимо от количества аналитов (в разумных пределах, конечно). Таким образом, основное преимущество предложенного подхода заключается в использовании одного сорта частиц для обнаружения пяти различных аналитов.

Белковые микрочипы, полученные ЭР на диализной мембране, состояли из непрерывно повторяющихся идентичных кластеров 3×3 . Каждый кластер содержал пять зон антител плюс один отрицательный контроль – Ova и три положительных контроля - СТ. Схема микрочипа представлена в нижнем правом углу рис. 3. Три зоны положительного контроля, расположенные углообразно, использовали для однозначного позиционирования рабочих зон.

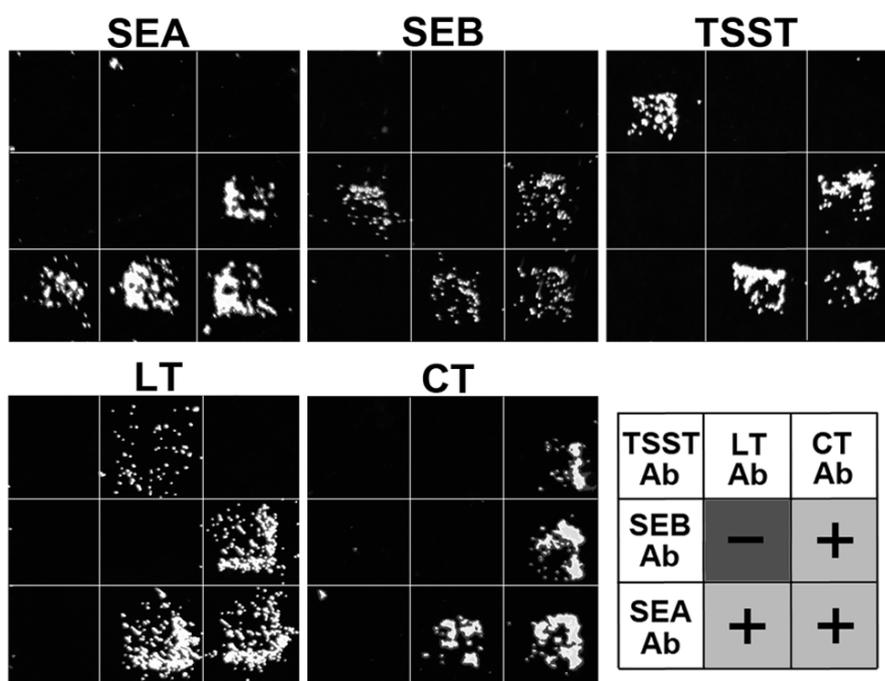


Рис. 3. Иллюстрация специфичности анализа. В каждом эксперименте в анализе использовали по 100 мкл каждого токсина в концентрации 1 мкг/мл. Для ясности просмотра отдельные пятна обрاملены, схема микрочипа приведена в правом нижнем углу. Знак (+) обозначает

положительный контроль (СТ), знак (-) - отрицательный контроль (Ova), другие зоны представляют собой антитела, специфичные к указанным токсинам.

При размере видимого участка микрочипа в проточной ячейке в 250 мкм^2 (рис. 4В) во время анализа видны около 50 отдельных кластеров, что делает возможным надёжную статистическую обработку сигнала.

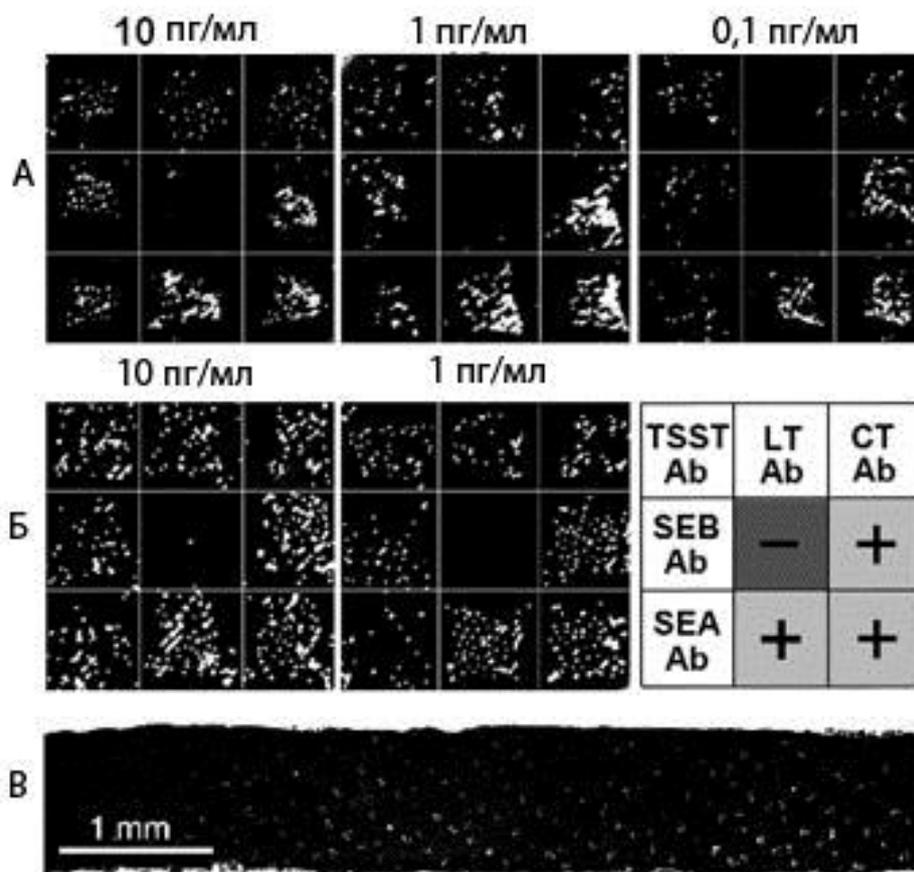


Рис. 4. Иллюстрации сигналов, полученных на реальных образцах с различными концентрациями добавленных токсинов. (А) - речная вода, (Б) - молоко. Панель (В) иллюстрирует общий вид микрочипа, видимого в области проточной ячейки (образец: водопроводная вода, содержащая 1 пг/мл TSST). Концентрация каждого токсина в смеси указана в верхней части изображения. Для ясности просмотра отдельные зоны обрамлены.

Хотя все пары антител, использованные в работе, были оценены на перекрёстную реактивность в стандартном формате ИФА, оказалось, что их использование в «активном» анализе не всегда бывает успешным: из трёх пар антител против LT только одна подошла для «активного» анализа, тогда как другие показали заметную перекрёстную реактивность с СТ, которая не была существенной в стандартном ИФА. Это связано с тем, что требования к антителам, которые используются в «активном» анализе, отличаются от требований, предъявляемым в традиционном формате иммуноанализа [23]. Распознавание антигена в данном методе основано на механической

прочности связи антиген-антитело, выражаемой временем жизни связи под нагрузкой, приложенной к связанной частице в сдвиговом потоке, тогда как в обычном ИФА антигены дифференцируются по их равновесным константам связывания. Хотя константа кинетической диссоциации хорошо коррелирует с термодинамической константой диссоциации, механическая прочность связи зависит от многих других факторов, влияющих на разрыв связи антиген-антитело [52]. После предварительных испытаний на специфичность плохо работающие антитела отбраковывали. Отобранные антитела не проявляли перекрёстной реактивности даже при высоких концентрациях токсинов (рис. 3, ложноположительные сигналы не видны при концентрациях до 1 мкг/мл). Эти эксперименты демонстрируют отсутствие перекрёстной реактивности как между первичными, так и вторичными биотинилированными антителами, так как в смеси они не проявляют перекрёстной реактивности к различным токсинам в «активном» формате анализа. Для определения ПрО для каждого токсина были построены градуировочные графики зависимости значения сигнала от концентрации аналита и рассчитаны стандартные отклонения по данным 20 микрочипов. Пределы обнаружения составили $\sim 0,1$ пг / мл для SEA, SEB, TSST и СТ и 1 пг / мл для LT. В случае TSST и SEB положительный сигнал был виден даже при концентрации 0,01 пг / мл (рис. 5), однако он был получен только в двух из трёх экспериментах.

Таким образом, электрофоретическое концентрирование аналита уменьшает ПрО примерно на 3 порядка: от 100 пг/мл СТ при выключенном электрическом поле до $\sim 0,1$ пг/мл с электроконцентрированием.

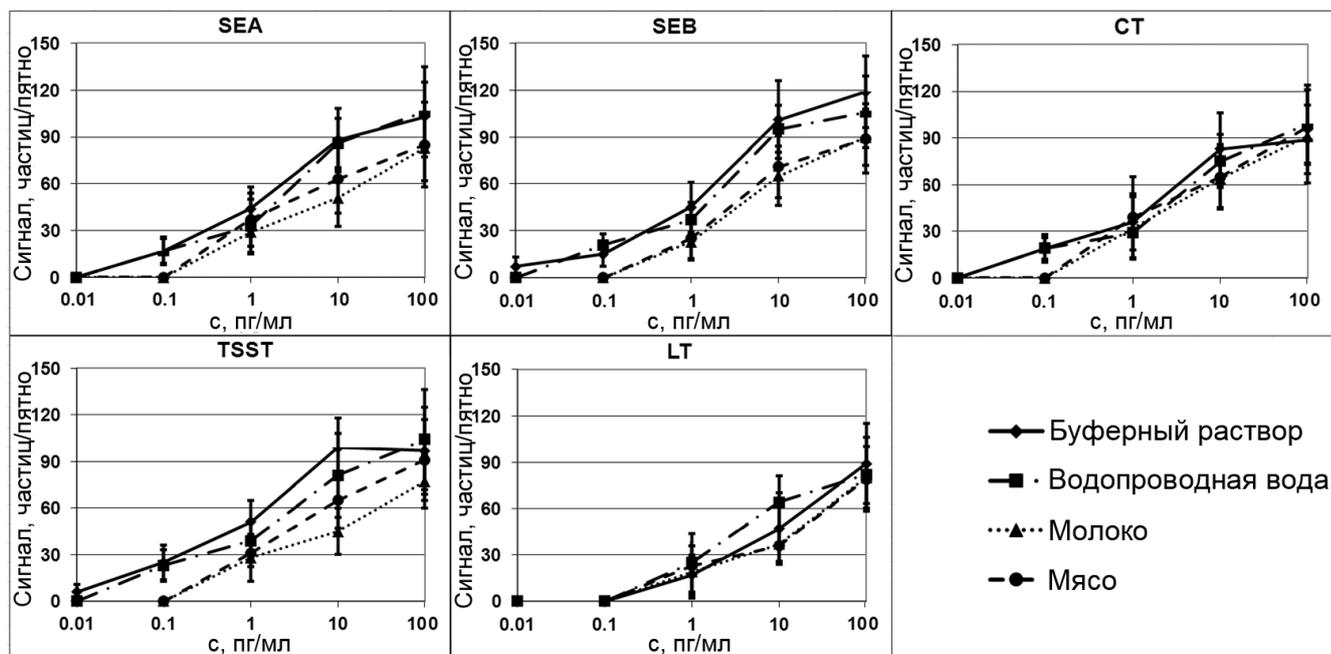


Рис. 5. Зависимость сигналов от концентрации токсинов в разных средах. Пределы погрешности соответствуют $2,5 \times CO$. Средние величины положительного контрольного сигнала составляли 103

± 31 частиц/зону для буферного раствора, 121 ± 38 частиц / зону для образцов воды, 89 ± 33 частиц / зону для образцов молока, 96 ± 29 частиц / зону для образцов мясного экстракта. Уровень фона - 1 ± 1 частица / зону.

Несмотря на использование антител с относительно низким сродством (константы диссоциации, K_d , лежат в наномолярном диапазоне), в случае использования активного анализа были получены значения пределов, соответствующие концентрациям антигена 10^{-14} - 10^{-15} М. Такие концентрации находятся далеко за пределами обнаружения, характерных для обычного ИФА и других «пассивных» методов иммуноанализа с использованием тех же антител. Причина заключается в том, что при таком способе проведения иммуноанализа на поверхности микрочипа происходит концентрирование заряженного аналита в слое микронной толщины. Фактически, в активном способе не накладывается требование относительно высокой аффинности антител. При низкой концентрации аналита вероятность его связывания с антителом пропорциональна отношению $C_{eff} / (K_d + C_{eff})$, где C_{eff} - эффективная концентрация антител в тонком слое раствора над поверхностью микрочипа. Так как в зоне обнаруживаются приблизительно 100 нг/см^2 активных молекул антител [44], C_{eff} составляет $\sim 10 \text{ мкМ}$, а поскольку для большинства антител $C_{eff} \gg K_d$, любая молекула аналита, появившаяся в слое, будет связана. Единственное требование к антителам состоит в том, чтобы комплекс антиген-антитело смог выдержать всю процедуру анализа, то есть время жизни комплекса должно превышать несколько минут. Стоит напомнить, что в данном методе антигены дифференцируются не по термодинамической стабильности связи антиген-антитело, а по её механической прочности, которая определяет специфичность активного анализа.

2.1.3. Обнаружение токсинов, добавленных к реальным образцам

Применение «активной» технологии ограничено требованием относительно низкой электропроводности анализируемого образца. Высокая проводимость не позволяет использовать высокие электрические поля при электрофорезе без перегрева раствора в проточной ячейке. Для разработанной конструкции максимальная мощность была установлена как $\sim 1 \text{ Вт}$. При этой мощности раствор, проходящий через проточную ячейку, нагревался на $5 - 7 \text{ }^\circ\text{C}$. При проводимости от 11 мСм / см и напряжении до 250 В можно использовать скорость потока 40 мкл/мин . Однако такие экстремальные условия практически не применялись: образцы обессоливали до проводимости менее 2 мСм/см . Так как пресная вода из природных источников (река и пруд) и водопроводная вода имели проводимость $0,5$ - $0,6 \text{ мСм / см}$, они были использованы без предварительной пробоподготовки. Другие анализируемые образцы, такие как пищевые продукты или морская вода, содержат гораздо более высокие концентрации соли и поэтому для электрофоретического анализа нуждаются в обессоливании. Показано, что такая процедура может

быть выполнена за 3 - 4 мин, используя, например, колонки Quick Spin Protein (Roche Diagnostics Corp.). Кроме того, некоторые образцы (мясо и молоко) содержат сложные белковые и жировые смеси, которые требуют дополнительных стадий пробоподготовки. Если в образцах мяса и молока после центрифугирования начальная проводимость составляла 5,5 и 9,5 мСм / см соответственно, то после обессоливания, как описано выше, проводимость снижалась до 0,4 мСм / см. Концентрации белка и жира в обессоленных образцах составили 0,5% и 0,02% для мясного экстракта и 1,5% и 0,5% для молока. ПрО токсинов в образцах воды из различных источников оказались такими же, как и в модельных средах, описанных выше (~1 пг / мл для LT и ~ 0,1 пг / мл для всех других токсинов, как показано на рис. 5). В то же время значения ПрО токсинов в молоке и мясном экстракте составили ~1 пг / мл. Репрезентативные изображения микрочипов представлены на рис. 4. Чтобы определить, было ли снижение чувствительности результатом потери токсинов на стадии обессоливания на гель-фильтрационной колонке, были проведены контрольные эксперименты, в которых токсины добавляли к образцам продуктов после обессоливания. Значения ПрО в контрольных образцах соответствовали значениям, полученным в воде (данные не показаны), что указывает на то, что токсины частично терялись во время процедуры обессоливания, в то время как на «активный» иммуноанализ присутствие белков, жиров и других макромолекулярных компонентов в молоке и мясных экстрактах существенного влияния не оказывало. Стоит также отметить, что ПрО, полученные для одновременного выявления всех пяти биотоксинов, совпадают с величинами для одиночных белков. Таким образом, обнаружение каждого токсина не зависит от присутствия других токсинов в образце. Более того, принимая во внимание, что содержание белка в молоке и мясе составляет не менее 1%, биотоксины могут быть обнаружены среди ~10¹⁰-кратного избытка других белковых молекул.

Динамический диапазон метода составляет по концентрации около трех порядков (рис. 5). Сигналы, полученные в разных средах для одной и той же концентрации аналита, близки друг к другу (в пределах доверительных интервалов), однако средние значения немного выше в воде и в модельном растворе по сравнению с молоком и мясным экстрактом. Значения сигналов при концентрации биотоксина 100 пг / мл близки к положительному контролю, указывая на полное насыщение всех мест связывания. Также можно заметить, что, хотя значение среднего сигнала устойчиво растёт с увеличением концентрации аналита, доверительные интервалы сигналов относительно широки и часто пересекаются друг с другом при различных концентрациях токсинов. Наиболее вероятной причиной такой изменчивости является неравномерность поверхности микрочипов. Как следует из рис. 4С, в зонах микрочипа наблюдается заметное изменение интенсивности сигнала. Хотя частично вариации в интенсивности могут быть объяснены истощением концентрации токсинов на выходе из проточной ячейки из-за связывания с микрочипом, большая часть возникает из-за неоднородной поверхности диализной мембраны,

что приводит к увеличению стандартного отклонения. При этом градиент магнитного поля, который определяет силу, с которой притягиваются МЧ, в области сканирования изменяется не больше, чем на 10% [44]. Несколько более высокий сигнал может быть получен (как для конкретных, так и контрольных точек) в областях, где градиент магнитной индукции выше. Надо отметить, что неравномерность поверхности представляет собой значительную проблему и в «традиционных» методах анализа на основе микрочипов [53]. Из вышесказанного следует, что применение магнитных меток для детекции сигнала на микрочипах наряду с существенными достоинствами имеет недостаток в виде невысокой точности анализа и в наибольшей степени подходит для анализов, в которых нужно быстро и с высокой чувствительностью и специфичностью получить результат «да или нет». Для многих задач такой результат может быть вполне подходящим.

2.1.4. Выводы к разделу 2.1.

Показано, что высокоэффективные аналитические тест-системы могут быть разработаны на основе «активной» технологии анализа. Основным результатом данной работы является мультиплексирование ультрачувствительного иммуноанализа с магнитными метками. Благодаря дополнительной стадии электрофоретического концентрирования детектирующих биотинилированных антител отсутствует необходимость использования в анализе множества различных сортов магнитных частиц с антителами разной специфичности. В результате число одновременно детектируемых аналитов ограничено только количеством активных зон на микрочипе и может составлять до нескольких десятков. Описанный анализ позволяет одновременно выявлять в образцах пищевых продуктов, а также в образцах воды из различных источников пять бактериальных токсинов (SEA, SEB, TSST, LT и CT) с чувствительностью 0,1-1 пг/мл менее, чем за 10 мин. Учитывая самую большую молекулярную массу токсина ~80 кДа и объём образца 100 мкл, полученное значение предела обнаружения соответствует ~100 зептомоль (~1 фМ) или 10^5 молекул токсина в образце. Благодаря быстрой процедуре пробоподготовки легко анализировать как простые образцы (вода из разных источников), так и сложные, такие как молоко и мясо. Метод не требует сложных и дорогостоящих устройств и может быть воспроизведён в любой лаборатории с минимальным техническим оснащением. Уникальные характеристики делают предложенную технологию перспективным инструментом для разработки практически важных тест-систем для детекции различных антигенов. Однако результаты исследования указывают также на необходимость развития предложенной технологии с целью уменьшения ошибки и повышения точности анализа.

2.2. Количественный ультрачувствительный иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками

Успешная комбинация электрофоретического сбора заряженных молекул аналитов с их детекцией после связывания на микрочипах с помощью магнитных частиц позволяет достичь PrO в несколько сотен молекул белка или вирусных частиц в 100 мкл раствора с зептомолярной концентрацией определяемого вещества [22]. Хотя данный формат исключает все процессы, контролируемые диффузией, он сохраняет специфичность, поскольку вместо распознавания антигенов по разности констант связывания молекул антител, он распознает их по различию конечной силы, необходимой для разрушения комплексов антиген-антитело [23, 54]. Однако такой формат иммуноанализа страдает одним ограничением, а именно, низкой точностью при измерении концентрации аналита. Как показано в предыдущей главе, низкий динамический диапазон в сочетании с высокими вариациями сигнала в иммуноанализе с магнитными метками позволяют измерять концентрацию аналита с точностью всего $\pm 0,5$ - 1 десятичный порядок. В работах, в которых также изучали зависимость сигнала (количество частиц в зоне или поверхностная плотность связанных с чипом частиц) от концентрации аналита, пропорциональной зависимости также не наблюдалось [55]. Отношение логарифма сигнала к логарифму концентрации (\log / \log) было всегда меньше единицы [56-58], а в некоторых случаях - ниже 0,1 [59]. Одним из следствий такой слабой зависимости сигнала от концентрации является низкая разрешающая способность при измерении концентрации. Низкий коэффициент \log / \log серьёзно ограничивает приложения, в которых требуются как низкий PrO , так и высокая точность, например, при анализе биомаркеров рака в биологических жидкостях. Поэтому в дальнейшей работе основное внимание было уделено разработке нововведений, которые позволили повысить точность метода и обеспечили количественные измерения концентраций аналита вплоть до 10 фг/мл. Улучшения были достигнуты путём (i) введением внутренней нормировки сигнала по отношению к сигналу положительного контроля на том же микрочипе и (ii) проведения измерения в линейном диапазоне градуировочного графика при концентрациях, близких к пределу обнаружения. Применение усовершенствованного метода продемонстрировано измерением концентраций моноклональных антител, специфичных к антигенам, секретлируемым *M. tuberculosis*.

2.2.1. Материалы и процедура титрования

Химические реагенты, антитела мыши (m-IgG) и человека (h-IgG), поликлональные антитела против m-IgG и h-IgG приобретены в Sigma-Aldrich Co. В работе были использованы рекомбинантные антигены ESAT-6 и Pst1, секретлируемые *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), фирмы BEI Resources (Manassas, VA, США), а также моноклональные антитела к ESAT-6 (клон 11G4) и к Pst1 (клон НТМ82) фирмы Abcam. Туберкулез (ТБ) -отрицательная

сыворотка крови из набора ИФА для тестирования противотуберкулёзных препаратов была приобретена в Институте Пастера (Санкт-Петербург, Россия). ТБ-положительная сыворотка крови получена у добровольцев.

Образцы для калибровок и анализов готовили разбавлением коммерческих антигенов и антител имидазол-глициновым буфером. Для измерения в общем пуле титра специфических антител анализировали серию разведений одного и того же образца, начиная с самого высокого, при котором отсутствовал сигнал на анти-m-IgG-зонах. Это разведение устанавливалось в отдельных экспериментах. При каждом разбавлении после того, как изображение было зафиксировано, МЧ смывали потоком буферного раствора до следующего измерения.

Процедура анализа состояла из двух этапов. На первом образец сыворотки, разбавленной имидазол-глициновым буфером (10 мМ имидазол / 5 мМ глицин, рН 8,6), объёмом 100 мкл пропускали через проточную ячейку в течение 3 мин при постоянном напряжении 150 В. Затем суспензию покрытых соответствующим антителом МЧ (0,001 мас. %) в имидазол-глициновом буфере с 0,5% ПВС и 0,5% ПВП прокачивали через ячейку со скоростью потока 8 - 12 мл/мин в течение 2 мин. Геометрия проточной ячейки позволяла одновременно получать изображения 15 микрочипов (3 × 3 зоны). Весь анализ занимал ~5 мин.

2.2.2. Снижение вариации сигнала путём его нормировки на положительный контроль

Дизайн микрочипа, представленный на рис. 6А, позволяет одновременно выявлять общий (m-IgG) и специфичный к секретируемым *M. tuberculosis* антигенам ESAT-6 и PstS1 IgG мыши. Микрочип состоял из семи зон: двух антигенов ESAT-6 и PstS1, секретируемых *M. tuberculosis*, специфического поликлонального антитела к m-IgG, три m-IgG в качестве положительного контроля и Ова в качестве отрицательного контроля. Зависимость сигнала от концентрации антигенов описывается сигмоидной кривой с динамическим диапазоном ~3 порядка (рис. 6Б), как это было описано ранее в других наших работах по анализу антигенов на микрочипах с детекцией магнитными метками [60]. Рассчитанное по градуировочным графикам значение ПрО для всех исследованных аналитов составило ~10 фг/мл (рис. 6Б).

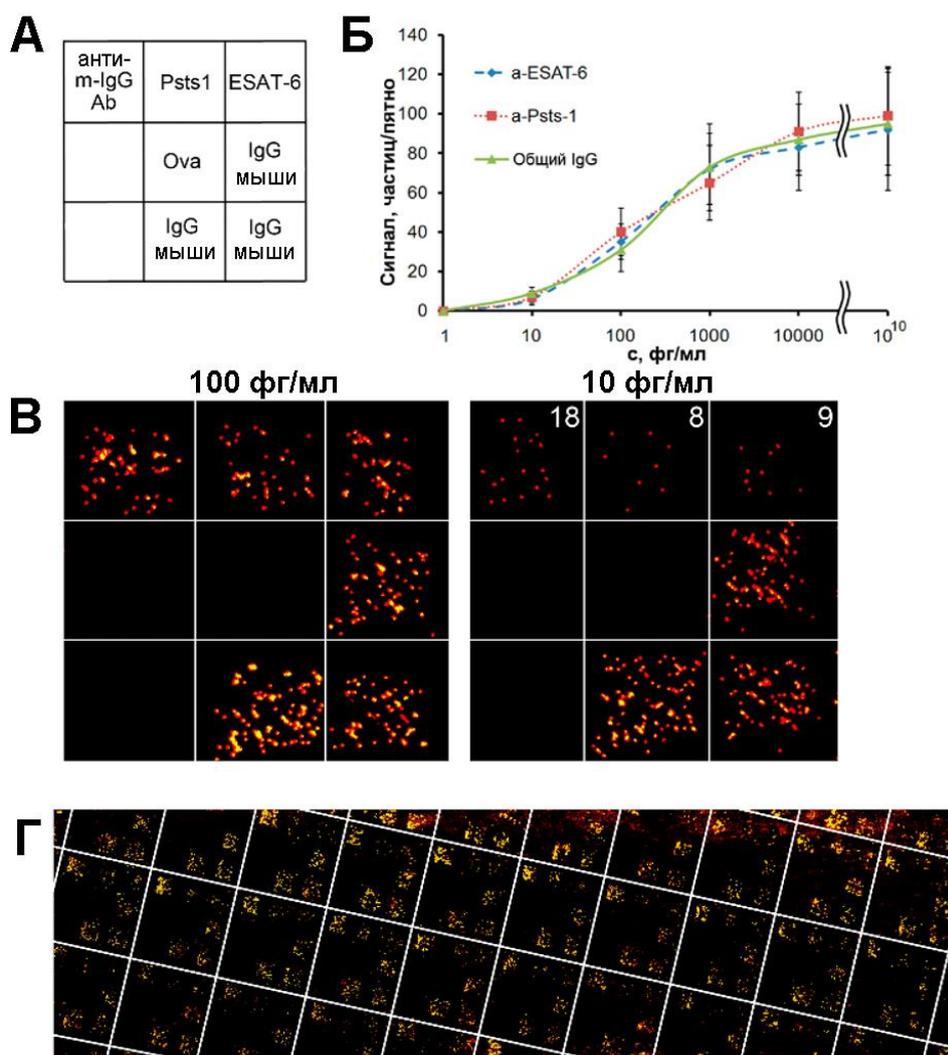


Рис. 6. (А) Дизайн микрочипа, используемого в модельном анализе. (Б) Градуировочные графики, полученные для трёх антител. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$. (В) Изображения сигналов, полученных для образцов с различными количествами ТБ-специфических антител, указанных в верхней части изображения. Для ясности просмотра отдельные зоны обрамлены. Размер каждой зоны - $100 \times 100 \text{ мкм}^2$. Объём образца - 100 мкл. (Г) Иллюстрация всей площади микрочипа, полученной при анализе 1 мкл сыворотки крови человека, разбавленной до 100 мкл электродным буфером.

Используя магнитные частицы, покрытые антителами против m-IgG, в одном эксперименте можно определить в общем пуле долю специфических антител путём деления сигнала, появляющегося в зоне антигена, на сигнал, характеризующий общий IgG, связанный с зонами анти-m-IgG.

На рис. 6Г видно, что интенсивность сигнала на различных повторах микрочипа существенно варьирует, что приводит к снижению точности измерения среднего значения. Чтобы повысить точность измерения концентраций, была введена процедура внутренней нормировки сигнала. Для

каждого микрочипа количество частиц в трёх зонах положительного контроля усреднялось, и количество частиц в зонах, соответствующих специфическому сигналу, делили на это усреднённое значение. Таким образом, значения сигналов были трансформированы в доли от интенсивности положительного контроля. Как следует из рис. 7А, относительные ошибки измерения сигнала, вычисленные по всем видимым микрочипам на рис. 6Г с нормировкой на положительный контроль, уменьшились почти наполовину. Как следствие, с введением внутренней нормировки существенно уменьшились локальные вариации сигнала, вызванные градиентами магнитного поля, скорости потока, различием в качестве микрочипов и др.

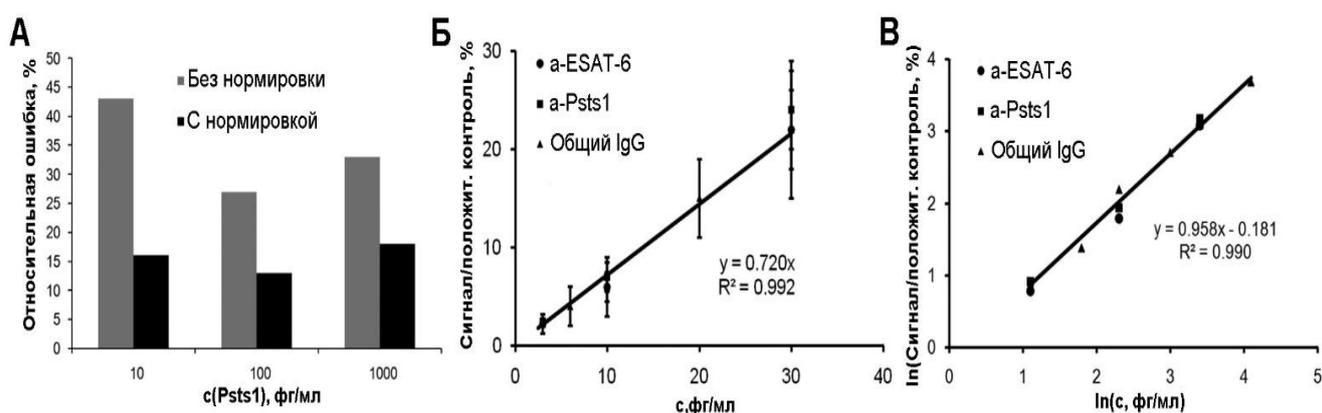


Рис. 7. Применение внутренней нормировки сигнала в иммуноанализе ESAT-6, Psts-1 и IgG. (А) Относительная ошибка определения Psts-1 (сигнал/ среднее значение сигнала) при различных концентрациях аналита. (Б) Зависимость нормированного сигнала от концентрации аналита вблизи ПрО. Пределы погрешностей соответствуют 2.5 x СО. (В) Та же зависимость, представленная в двойных логарифмических координатах и демонстрирующая наклон, равный единице.

Однако, хотя введение внутренней нормировки уменьшило вариации сигнала, точность количественного измерения сигнала осталась невысокой вследствие слабой зависимости сигнала от концентрации. Поэтому для улучшения эффективности анализа было предложено ещё одно нововведение.

2.2.3. Количественное определение фемтомолярных концентраций иммуноглобулинов

Было замечено, что вблизи предела обнаружения сигнал пропорционален концентрации анализируемого веществ. В этой области наклон градуировочного графика в двойных логарифмических координатах близок к единице (рис. 7Б) и быстро уменьшается при повышении концентрации аналита. Это обстоятельство имеет чрезвычайно важное значение, так как сильная зависимость сигнала от концентрации вблизи ПрО делает возможным ее количественное измерение. Чтобы найти область линейного участка, который растянут по концентрации аналита

примерно на порядок, была проанализирована серия 10-кратных разведений одного и того же образца, начиная с самого высокого. Для количественного измерения использовался результат анализа с самым высоким разведением, при котором появлялся достоверно определяемый сигнал. В результате, достигается точность измерения концентрации аналита $\pm 30\%$. Это значение складывается из прецизионности ($\sim 20\%$), определяемой ошибкой измерения наклона градуировочного графика, и воспроизводимости ($\sim 20\%$), определяемой вариациями значений сигнала.

Результаты анализа ТБ-специфических антител, представленные на рис. 6В, демонстрируют сильную зависимость сигнала от количества анализируемого вещества вблизи предела обнаружения: десятикратное увеличение концентрации аналита приводит к почти десятикратному увеличению количества МЧ. Например, анализ образца, содержащего 10 фг/мл анти-PstS1 и 10 фг/мл анти-ESAT-6 (общая концентрация специфических IgG - 20 фг/мл) приводит к значениям сигнала 8 частиц для анти-PstS1 и 9 частиц для ESAT-6 (рис. 6В). В то же время сигнал в зоне анти-mIgG, которое характеризует общую концентрацию IgG (20 фг/мл), в два раза больше – 18 частиц. Таким образом, только в области фемтограммового уровня аналита сигнал прямо пропорционален концентрации, тогда как при более высоких концентрациях в диапазоне 100-1000 фг/мл наклон составляет $\sim 0,3$ и далее достигает насыщения (рис. 6Б). Из этих наблюдений следует важный вывод. Если предварительно провести процедуру титрования аналита, включающую регистрацию сигнала при последовательном разведении образца на одном и том же микрочипе, то в области предела обнаружения можно установить концентрацию анализируемого вещества с точностью 30%.

2.2.4. Специфичность анализа и пределы обнаружения туберкулезных антигенов ESAT-6 и PstS1

Для определения специфичности иммуноанализа использовались высокие концентрации антител – до 100 мкг/мл. На рис. 8А показаны репрезентативные примеры изображений микрочипов, полученных в одном из экспериментов. На рис. 8Б,В приведены градуировочные графики для определения ПрО антител против ESAT-6 и PstS1. Никакой перекрёстной реактивности между антигенами ESAT-6 и PstS1 не было обнаружено, и только при концентрации IgG 100 мкг/мл появлялся слабый сигнал. Это можно объяснить присутствием молекул IgG с низким сродством к ESAT-6 и PstS1 в сильно гетерогенном пуле иммуноглобулинов. При более низкой общей концентрации IgG, 10 мкг/мл, которая используется в анализе, сигнал отсутствовал. Как следует из рис. 8Б,В, добавление иммуноглобулинов в образец в таких концентрациях существенно не влияло на градуировочные графики для антиген-специфических IgG. Принимая во внимание значение ПрО для специфических IgG ~ 10 фг/мл, можно утверждать, что аффинные

антитела работают эффективно в присутствии 10^9 -кратного избытка неспецифических антител (10 фг/мл) / (10 мкг/мл) = 10^{-9}).

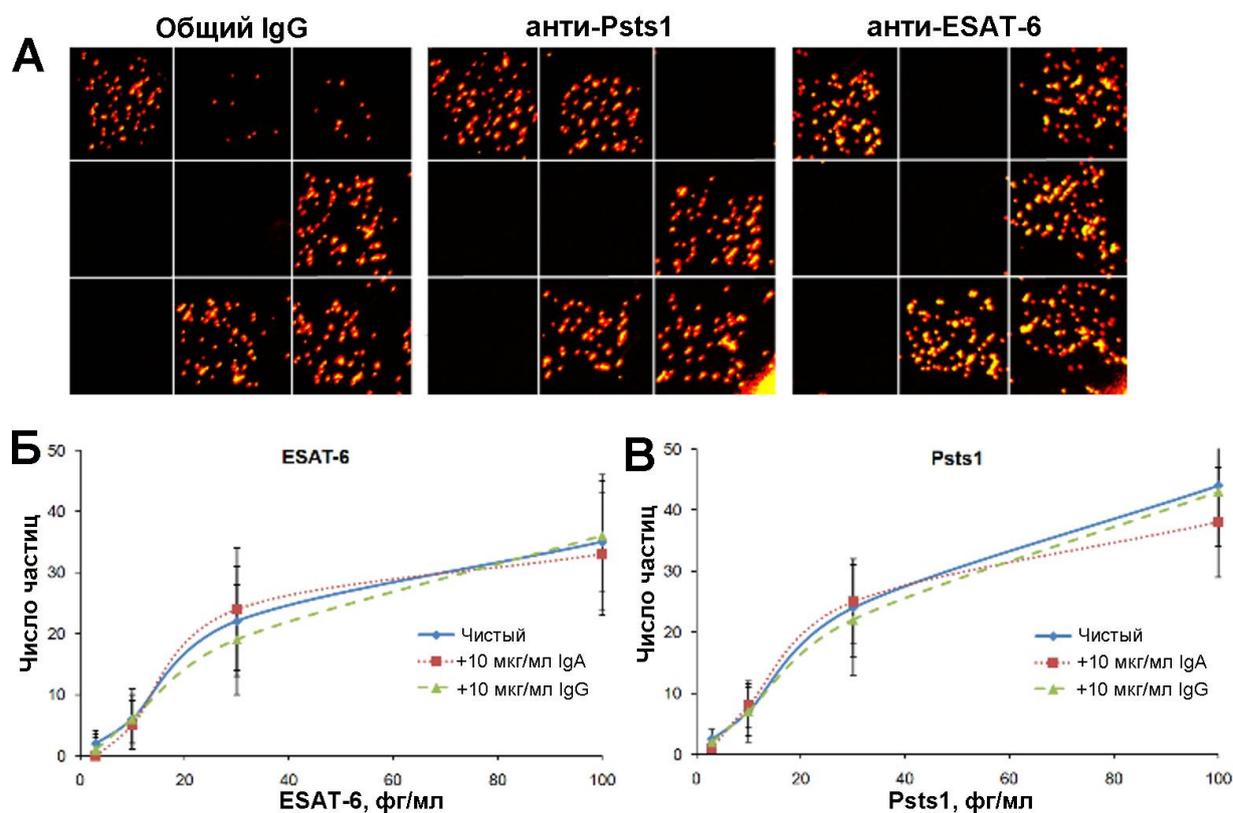


Рис. 8. (А) Иллюстрация специфичности анализа. В каждом анализе использовали 100 мкл раствора антител, указанных в верхней части рисунка, с концентрацией 100 мкг / мл. Для ясности отдельные зоны обрاملены. (Б, В) Зависимость сигналов от концентрации ESAT-6 (Б) и PstS1 (В) в разных средах. Пределы погрешностей соответствуют 2, 5 x CO.

2.2.5. Определение содержания туберкулёз-специфического IgG в крови человека

Эффективность метода, включающего нововведения, для количественных измерений аналитов на микрочипах была протестирована в иммуноанализе на ТБ-специфические антитела в крови человека. Дизайн используемых для этого микрочипов представлен на рис. 9А. Детекцию проводили магнитными метками, покрытыми антителами против h-IgG. Было показано, что значения сигналов и ПрО для общего IgG человека и IgG мыши оказались идентичны. Поэтому для ТБ-специфических иммуноглобулинов человека был использован тот же градуировочный график, что и для моноклональных ТБ-специфических антител мыши (рис. 6Б).

Линейная часть градуировочного графика была растянута до одного порядка по количеству аналита. Поэтому для определения титра ТБ-специфических антител, был проанализирован ряд 10-кратных разведений образцов сыворотки крови. Для вычисления содержания аналита с помощью градуировочного графика использовали нормированные значения сигнала (рис. 7В).

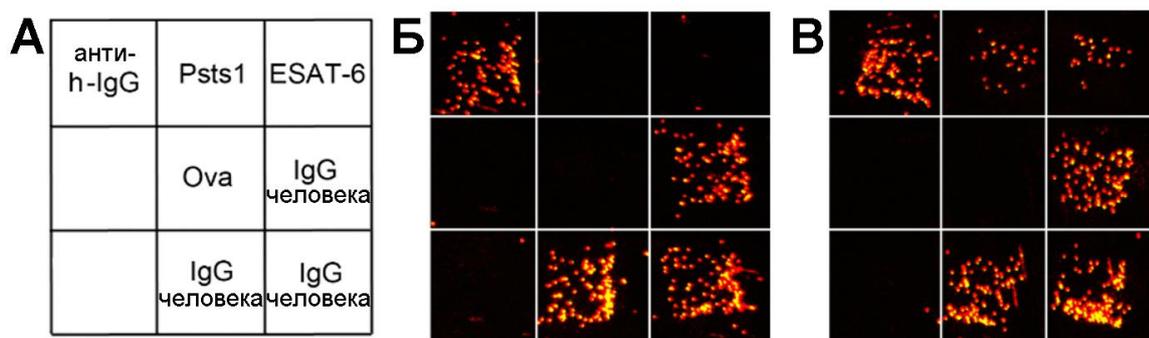


Рис. 9. Иллюстрации сигналов, полученных при анализе образцов крови человека. (А) Дизайн микрочипа. (Б) Анализ контрольного образца, не содержащего противотуберкулёзные антитела (1 мл сыворотки разбавлен в 100 раз буфером). (В) Анализ в тех же условиях образца крови добровольца, положительного на ТБ-специфические антитела.

В качестве первого образца использовали отрицательный контроль из коммерческого набора ИФА для выявления туберкулёза. Никакого положительного сигнала к ТБ-специфическому антигену не наблюдали даже при минимально возможном разведении 1: 100; при меньших разведениях анализ не может быть выполнен из-за повышенной электропроводности сыворотки крови. Исходя из полученных данных, общая концентрация h-IgG в образце составила 0,8 мг/мл. Таким образом, доля ТБ-специфического иммуноглобулина в отрицательном контроле была ниже $(1 \text{ фг/мл}) / (0,8 \text{ мг/мл}) \sim 10^{-12}$. В случае анализа образца крови добровольца рабочие зоны с антигенами Psts1 и ESAT-6 стали видимыми при разведении 1: 100 (рис. 9). Средние значения сигнала составили 21 ± 7 частиц/пятно (нормированное значение - $26 \pm 4\%$ от положительного контроля) для анти-Psts1-IgG и 18 ± 6 частиц/пятно (нормированное значение - $22 \pm 3\%$ от положительного контроля) для анти-ESAT-6-IgG. Вычисленные на основании градуировочного графика концентрации анти-Psts1-IgG и анти-ESAT-6-IgG составили $3,6 \pm 1,1$ пг/мл и $3,0 \pm 1,0$ пг/мл соответственно. При этом концентрация общего IgG в образце была определена на уровне $1,3 \pm 0,3$ мг/мл. Следовательно, анализ серии 10-кратных разведений одного и того же образца позволил определить долю ТБ-специфических антител относительно общего иммуноглобулина на уровне $(2-3) \times 10^{-9}$. Это означает, что предложенная методика количественного анализа позволяет измерять крайне низкие титры антиген-специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови.

Таким образом, для улучшения количественного иммуноанализа на микрочипах предложены важные нововведения. Во-первых, удалось уменьшить разброс в уровне сигнала (количество или плотность частиц) путём введения внутренней нормировки для каждого микрочипа. Такой подход существенно уменьшает локальные колебания сигнала, вызванные различными факторами, в том числе различиями в температуре и сдвиговом потоке. Например, изменения в градиенте магнитного поля, создаваемого острым наконечником магнита, оценивается примерно в 10% [44].

Скорость потока внутри канала ячейки в центре выше, что приводит к более высокому напряжению сдвига, а температура ниже, потому что теплообмен более интенсивный. Процесс изготовления может приводить к различиям между индивидуальными микрочипами, например, к различным размерам зон. Другие факторы, такие как деформация мембраны, также способствуют изменению сигнала среди идентичных микрочипов. Деление интенсивности сигнала на интенсивность зоны положительного контроля на одном и том же микрочипе отфильтровывает вариации по шкале, сравнимой с размером микрочипов, ~300 нм, и снижает СО до 15-20%. Во-вторых, показано, что концентрационные зависимости сигнала в анализе с детекцией магнитными метками различаются при низких и высоких концентрациях. При концентрациях, близких к PrO , в пределах порядка величины, плотность связанных частиц увеличивается прямо пропорционально содержанию анализируемого вещества. Однако, при дальнейшем увеличении концентрации зависимость сигнала приобретает сигмоидную форму с приближением к определённому уровню насыщения. Известно, что низкие значения наклона градуировочных графиков ($\log/\log < 1$) являются типичными в гетерофазном анализе при использовании микронных частиц в качестве детектирующих меток [20, 56, 57]. Единичный наклон, который является общим для стандартного ИФА и всех анализов с использованием радиоактивных или флуоресцентных меток, никогда ранее не описывался для анализов, основанных на детекции с помощью микрочастиц. В работе продемонстрировано, что единичный наклон также присутствует в калибровке кривой для этого типа анализа, но его легко упустить из виду, поскольку динамический диапазон, в котором он наблюдается, довольно узкий.

Следует еще раз подчеркнуть, что в активном способе проведения иммуноанализа устраняются все диффузионно-контролируемые реакции, и выявление специфических аналитов зависит не от разницы в сродстве, K_d , а от уровня силы, который разрушает комплекс антиген-антитело [44], при этом образование комплексов происходит независимо от концентрации аналита. Проиллюстрируем эту точку зрения следующими оценками. Считается, что только до 50 нг/см² молекул антител доступны для связывания антигена на поверхности, покрытой иммуноглобулинами [61]. Учитывая, что электрофорез концентрирует заряженные молекулы белка на расстоянии около 2 мкм от поверхности микрочипов [62], получаем, что "эффективная" концентрация антител в этом слое достигает ~2 мМ. Из закона действующих масс, любая молекула аналита с $K_d < 2$ мМ, дошедшая до поверхности, будет связана независимо от его концентрации. Аналогичные рассуждения применимы и к анализируемому веществу, которое связывается с антителами, иммобилизованными на магнитной метке (аналогично высокой локальной концентрации вторичных антител). Для детекции аналита комплекс должен (i) прожить достаточно долго без приложения силы (несколько минут сбора) и (ii) выжить в течение нескольких секунд под действием силы ~ 3-6 пН [23], которая используется для удаления слабо

связанных МЧ. Первое условие обеспечивает экстремальную чувствительность (обнаруживаются даже единичные молекулы аналита), в то время как второе (способность противостоять силе) определяет специфичность анализа. Хотя получение зависимости сигнал-аналит с $\log/\log = 1$ является ожидаемым событием, ответ с $\log/\log < 1$ вызывает недоумение. Оно не может быть объяснено размером МЧ или их конкуренцией с сайтами связывания, так как при плотности 20 - 80 частиц на площади 100 - 100 мм^2 (рис. 6В) среднее расстояние между частицами составляет 11 - 22 мкм, т. е. в среднем они находятся достаточно далеко друг от друга, чтобы оказывать взаимное влияние. Можно предположить, что часть градуировочного графика с $\log / \log < 1$ связана с гетерогенной природой молекул антител, иммобилизованных на микрочипах и на частицах: в условиях стерических ограничений молекулы аналита и антител образуют нагруженные комплексы, что приводит к существенному увеличению эффективной K_d . При более высоких концентрациях аналита на микрочипе могут быть образованы многочисленные комплексы антиген-антитело, и тогда могут проявиться менее сильные антитела. Эта идея подтверждается следующим наблюдением: чем выше сила, применяемая для удаления несвязанных частиц, тем выше PrO ; и чем уже динамический диапазон, тем выше наклон \log / \log [43]. Однако, как сказано выше, градуировочный график всегда имеет начальный линейный участок, который часто упускается из виду.

2.2.6. Выводы к разделу 2.2.

Введение внутренней нормировки сигнала позволила значительно уменьшить погрешность измерения содержания аналита в фемтограммовой области. Показано, что в диапазоне концентраций вблизи предела обнаружения сигнал становится пропорциональным количеству белка. Это позволяет проводить количественные измерения аналитов в иммуноанализе на микрочипах. Описанная методология может найти применение во многих биомедицинских исследованиях, в которых нужно определять низкие концентрации белков. Одним из приложений может быть анализ выдыхаемого воздуха на присутствие биомаркеров заболеваний, таких как патогенные белки и патоген-специфические антитела, в качестве основы для создания новых неинвазивных методов диагностики лёгочных заболеваний, например, туберкулёза.

2.3. Применение нейлоновых наночистров для сбора микрокапель лёгочной жидкости из выдыхаемого воздуха

Одним из перспективных объектов для применения ультрачувствительных методов анализа являются аэрозоли различного происхождения. В частности, для неинвазивной диагностики лёгочных заболеваний большой практический интерес может представлять анализ наночастиц лёгочной жидкости, содержащихся в выдыхаемом пациентом воздухе. Однако эффективный сбор мелких (~100 нм) аэрозольных частиц является проблемой, для решения которой в нашей

лаборатории методом электропрядения (ЭП) с газофазной нейтрализацией были получены нанофильтры из нейлоновых волокон диаметром 30-60 нм. Практически невидимые, со светопропусканием $> 95\%$, чрезвычайно лёгкие ($10\text{--}20 \text{ мг/м}^2$), с диаметром волокон от 10 нм, что значительно меньше длины свободного пробега молекул воздуха, они сочетают низкое сопротивление воздушному потоку с низким проникновением субмикронных аэрозольных частиц. Для эффективного сбора аэрозоля из воздуха решающую роль играет как раз сочетание фильтрующих свойств и аэродинамического сопротивления материала, определяемое распределением пор в фильтре по размеру: чем более узкое распределение, тем лучше фильтрующие свойства. Было выявлено удивительное свойство фильтров: они оказались способны отбирать частицы по размеру и отсекают проникновение частиц, размер которых превышал пороговый уровень. В данной работе было смоделировано и проанализировано распределение размеров пор в получаемых наноматах. Стоит отметить, что такие нанофильтры представляют большой практический интерес: они могут быть использованы для диагностического сбора выдыхаемых микрокапель лёгочной жидкости, с их помощью можно тестировать образцы воздуха, собираемого в общественных местах, на содержание различных патогенов, при биотеррористической угрозе и т.д.

При неинвазивном сборе выдыхаемых нелетучих биомаркёров в виде конденсата микрокапли лёгочной жидкости (МЛЖ) служат затравкой для конденсации воды при охлаждении выдыхаемого воздуха. В литературных источниках описаны различные самодельные и коммерческие устройства для сбора конденсата и имеются данные об их успешном применении в диагностике [63]. Способ прост, недорог и не требует затрат энергии, однако многие авторы отмечают сильное и крайне переменное разведение лёгочной жидкости в образцах [64], из-за которого для обнаружения биомаркеров нужны чрезвычайно чувствительные методы анализа или предварительное концентрирование образцов после длительного сбора конденсата [65, 66]. Менее разбавленные образцы могут быть получены с использованием методов, в которых МЛЖ или их сухие остатки собираются на коммерческих фильтрах или с помощью инерционного или электростатического коллектора. Фильтры позволяют отделять МЛЖ от водяного пара, что приводит к получению проб с более высокими концентрациями биомаркёров. Шведские ученые успешно применили такую методику для обнаружения наркотических веществ в выдыхаемом воздухе [67]. Однако у такого способа сбора есть проблемы, связанные с переносом собранного материала в раствор для последующего анализа и выборочный по размеру сбор микрокапель выдыхаемой жидкости. Коммерческие фильтры хорошо задерживают самые маленькие ($1\text{--}20 \text{ нм}$) и самые большие ($> 1000 \text{ нм}$) капли, тогда как микрокапли с промежуточным размером через них проникают [68, 69].

Давно разработанный метод электроспиннинга (или электропрядения) предлагает высокоэффективный способ изготовления нетканых материалов из чрезвычайно тонких полимерных волокон для фильтрации воды и воздуха, тканевой инженерии и других применений [70-73]. В типичном производственном процессе сильно заряженные нановолокна наносятся на полированную металлическую пластину или барабан [74]. Хотя осаждение кажется случайным, имеются данные о том, что на плотность осаждения влияет профиль поверхности электрода: волокна преимущественно осаждаются на вершинах выступов [75, 76]. Напротив, если часть поверхности покрыта диэлектриком, поверхность накапливает заряды и выталкивает новые волокна из этой области [77]. Еще одной особенностью наноматов, нанесенных на полимерную пленку, являются «звезды» - места пересечения нескольких волокон [78]. Все эти факторы влияют на фильтрующие свойства наноматов, однако основным, определяющим качество фильтрации, является диаметр волокна. Хорошо известно, что уменьшение среднего диаметра улучшает качество фильтра, поскольку сопротивление воздушному потоку падает по мере его уменьшения [79]. Когда диаметр волокон, d , приближается к длине свободного пробега молекул газа в воздухе (65 нм при нормальных условиях), макроскопическая аэродинамика не может описать сопротивление таких фильтров из-за проскальзывания потока по поверхности волокна. Число Кнудсена, K_n , описывает вклад фактора скольжения и рассчитывается как $K_n = 2\lambda/d$. Считается необходимым учитывать эффекты скольжения [80], начиная с $K_n > 0,001$, но они особенно велики при $K_n > 0,25$, когда нановолокно ведет себя не как аэродинамический объект, а как большая молекула, в этом случае аэродинамические уравнения могут описать сопротивление потоку только при введении полуэмпирических поправок [81]. В нашей лаборатории показано, что уменьшение среднего диаметра нановолокон поливинилпирролидона с 280 нм до 20 нм (что соответствует увеличению K_n с 0,46 до 6,5) приводит к падению сопротивления воздушному потоку нанофильтра на две трети и падению массовой плотности полимера на четыре пятых при той же эффективности фильтрации [82].

Ранее Хуан и соавт. [83] продемонстрировали, что нановолокна толщиной до 2 нм могут быть изготовлены путём электропрядения (ЭП) нейлона-4,6, растворённого в муравьиной кислоте. Хотя наномат может быть сформирован из таких тонких нановолокон на поверхности электрода с помощью обычного электроспиннинга, в этом случае его трудно удалить с поверхности без повреждения [82]. Более перспективной является технология изготовления нанофильтров из отдельно лежащих волокон без применения подложки [78, 82, 84]. В этом случае фильтр образуется в отверстии экрана при электрораспылении раствора полимера с одной стороны экрана и этанола с другой, как показано на рис. 10. Газофазная нейтрализация имеет несколько преимуществ по сравнению с осаждением полимерных волокон на электроде. Во-первых, поскольку наномат формируется без подложки, его качество не зависит от профиля электрода. Во-

вторых, он не имеет дефектов, вызванных микроскопическими искрами, которые обычно сопровождают образование наноматов на электродах [85]. В-третьих, производимые наноматы могут быть очень тонкими, потому что нет необходимости удалять наномат с поверхности подложки. В дополнение, из-за малого диаметра нановолокон и благодаря неслучайному равномерному распределению свободного пространства между волокнами, нейлоновые нанофильтры демонстрируют превосходные фильтрующие качества. Кроме того, отсутствие автофлуоресценции и высокая оптическая прозрачность таких фильтров позволяют их использовать в исследованиях с применением флуоресцентного, оптического или сканирующего электронного микроскопа.

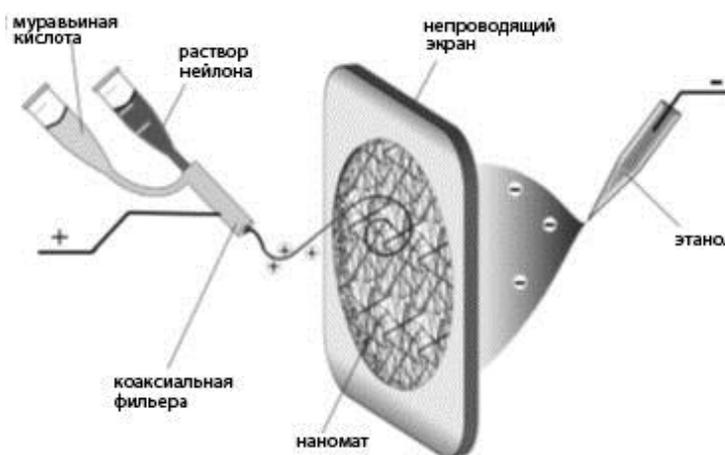


Рис. 10. Иллюстрация образования свободного наномата в отверстии экрана с помощью газофазной нейтрализации электрораспылённых нановолокон противоионами летучего растворителя (на примере этанола).

Конструкция и общие характеристики созданного в нашей лаборатории генератора наноаэрозолей описаны в публикации [86]. Для измерения диаметра волокон нанофильтра был использован атомно-силовой микроскоп SmartSPMTM-1000 (AIST-NT Co., Россия) в полуконтактном режиме. Предварительно микроскопное стекло тщательно промывали и обрабатывали высокочастотным плазменным разрядом. Наномат, образованный в отверстии, прижимали к поверхности стекла струёй воздуха. Слайд сканировали при влажности ниже 60%.

2.3.1. Расчёт распределения размеров пор в наноматах различного типа

Для расчёта распределения пор по размеру моделируемые наноматы конструировали из линейных волокон, распределённых по площади квадрата случайным образом. Каждое волокно проходило либо через две случайные точки, либо через одну под случайным углом. Ширина волокна принималась постоянной или выбиралась случайным образом. Экспериментальные изображения, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и атомно-

силовой микроскопии (АСМ), преобразовывали в двоичную форму, приписывая каждый пиксель либо к волокну, либо к поре. Распределение размеров пор как на моделируемых, так и на экспериментальных изображениях рассчитывали с использованием программного обеспечения собственной разработки, используя алгоритм, схема которого приведена на рис. 11.



Рис.11. Основные этапы алгоритма, используемого для расчёта распределения размеров пор.

После бинаризации отверстия изолировали с общим алгоритмом рекурсивной заливки: если пиксель растра был "0", его соседи также проверялись на наличие "0" и если это соответствовало действительности, их приписывали к одной и той же поре. После того, как все пиксели, соответствующие отверстию, были указаны, центральное положение и радиус наибольшего вписанного круга находили с помощью следующей итерационной процедуры. На первом этапе центр масс отверстия приписывали центру вписанной окружности и рассчитывали минимальное расстояние до границы поры. Площадь рассчитанного таким образом вписанного круга делили на $N \times N$ частей (в большинстве расчётов использовали $N = 7$), после чего рассчитывали минимальное расстояние от центра каждой из этих частей до границы отверстия. Часть, центр которой был самым отдаленным от границы, опять делили на $N \times N$ частей, и процедуру повторяли до тех пор, пока расстояние не оставалось постоянным с точностью до 1 пикселя. Для проверки правильности алгоритмов выделения пор и расчёта их размеров, испытания с порами различной формы проводили вручную. Распределение по размерам строили, когда максимальный вписанный диаметр круга был рассчитан для всех отверстий на фильтре.

2.3.2. Механизм образования пор в нанофильтрах, полученных электропрядением с газофазной нейтрализацией

Фильтрующие свойства нейлоновых наноматов были изучены к.ф.-м.н. А.Ю. Михеевым и приведены для демонстрации превосходства полученных в нашей лаборатории нанофильтров.

Соответствующие методики приведены в совместной работе [69]. Ультратонкий наномат достаточно прочен: после прикрепления к поддерживающей сетке он способен удерживать большую каплю жидкости (рис. 12 А).

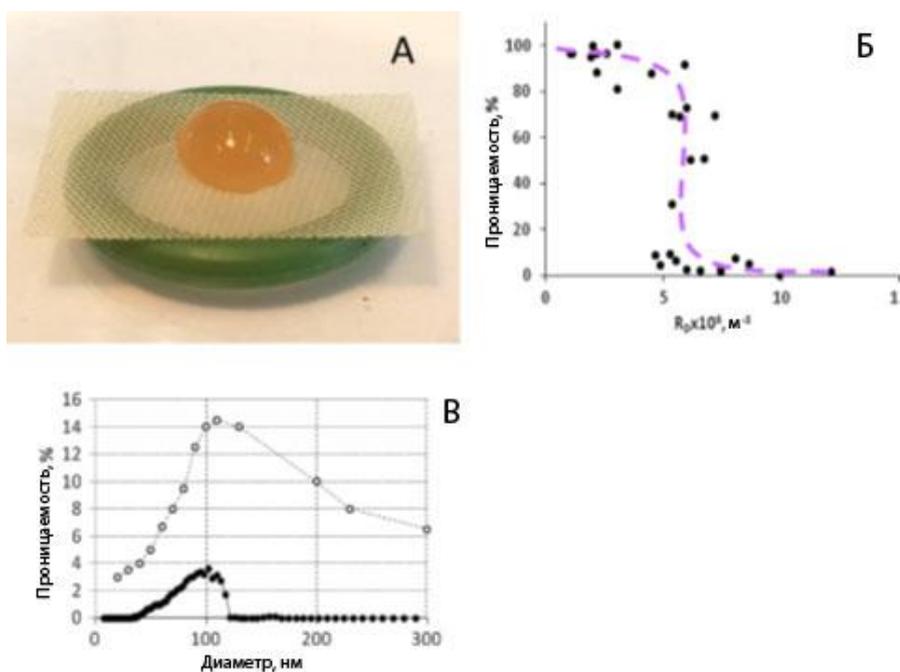


Рис. 12. Проникновение частиц nano- и субмикронного аэрозоля в зависимости от плотности нейлоновых волокон и размера частиц (выполнено к.ф.-м.н. А.Ю. Михеевым). (А) Устройство, используемое для изучения проникновения МЧ через фильтр. (Б) Проникновение МЧ диаметром $1 \pm 0,1$ мкм через фильтры с различным сопротивлением воздушному потоку, выраженным через коэффициент Дарси (R). (В) Проникновение аэрозольных частиц в зависимости от их диаметра при скорости потока - 1 м/с. Кружками представлена зависимость, полученная с помощью НЕРА фильтра.

Массовая плотность нейлоновых фильтров составляла $10\text{--}20$ мг/м², что соответствует 1/10 плотности наноматов со сравнимой фильтрующей способностью, описанной в литературе [87]. Сопротивление фильтров выражали через коэффициент Дарси, R, который пропорционален отношению общей длины волокон к площади L/S. Как и в НЕРА фильтрах, максимальное проникновение наблюдалось для частиц размером $\sim 0,1$ мкм, для которых как диффузионные, так и инерционные механизмы столкновения являются наименее эффективными при задержании частиц (рис. 13 В). Однако резкая разница между нейлоновыми и НЕРА фильтрами появлялась при сборе более крупных частиц. В этом случае проникновение через нейлоновый фильтр резко падало: частицы размером более 130 нм через него вообще не проникали. Такое поведение можно было бы ожидать от сита с калиброванными порами - особенность, которую никогда раньше не

описывали для наночистот, полученных ЭП. Подобное пороговое явление было отмечено и в другой работе нашей лаборатории [82]: проникновение через наночистот из волокон поливинилпирролидона резко снижалось до нуля при увеличении размера частиц наноаэрозоля с 80 до 150 нм, что указывает на то, что распределение пор в наночистотах не было случайным. В то время происхождение этого необычного распределения было совершенно неясным. Чтобы пролить свет на это необычное явление, было изучено распределение размеров отверстий в наноматах, изготовленных с помощью различных технологий, и проведено сравнение с чисто случайным распределением пор в смоделированных наноматах.

Как показано на рис. 13 А, для модельных наноматов со случайным расположением волокон логарифм доли пор, пронизываемых для частиц диаметром меньше d , хорошо описывается линейной функцией: $\ln [p(d)] = k_1d$, где коэффициент $k_1 = L/S$ (S - площадь квадрата и L - общая длина волокон в выделенной области).

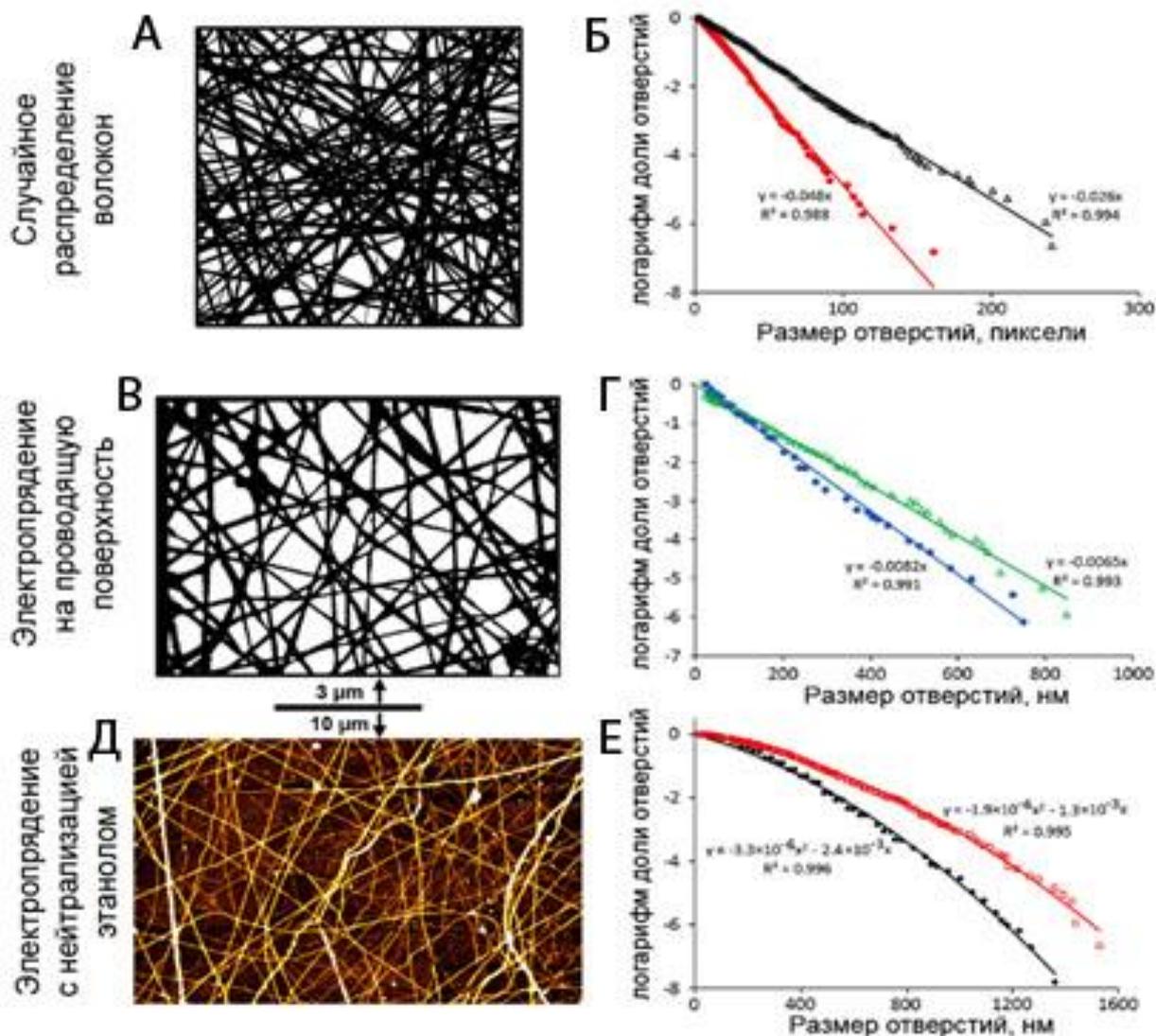


Рис. 13. Распределение размеров пор в моделируемых и реальных наноматах. (А) Изображение моделируемого наномата. (Б) Распределение пор в смоделированных фильтрах с плотностью волокна $L/S = 0,025$ пикселя⁻¹ (черный цвет) и $L/S = 0,05$ пикселя⁻¹ (красный цвет). (В) Бинаризованное изображение, использованное в расчётах. (Г) Распределение пор, рассчитанное для СЭМ-изображений описанных в литературе наноматов. (Д) АСМ-изображение реального наномата. (Е) Распределение пор в данном наномате, полученное с помощью АСМ (красная кривая) и СЭМ (черная кривая).

В результате, никакой зависимости распределения размеров пор от диаметра волокна обнаружить не удалось: смоделированные фильтры, состоящие из одинаковых волокон, а также состоящие из волокон с переменной случайной шириной, привели к аналогичным линейным полулогарифмическим зависимостям.

Расчёт распределения размеров пор для нескольких опубликованных изображений наноматериалов, полученных электропрядением на проводящую подложку без газофазной нейтрализации, показал, что модельные наноматы и наноматы, полученные осаждением на электроде, идентичны с точки зрения распределения размеров пор (рис. 14Б,Г). Как и в смоделированных фильтрах, наклоны полулогарифмических распределений в реальных фильтрах также были близки к значению k_1 : $L/S = 0,0092$ нм⁻¹ для изображения из работы [88], $k_1 = 0,0082$ нм⁻¹, измеренный по наклону прямой на рис. 14 Г; $L / S = 0,0071$ нм⁻¹ для изображения из работы [89] и $k_1 = 0,0065$ нм⁻¹, полученный из наклона прямой на рис. 14Г. Таким образом, независимо от того, насколько плотно нановолокна упакованы в фильтре, всегда присутствует фракция больших пор, что указывает на то, что как в модельных, так и наноматах, полученных на металлическом электроде, нет пороговой зависимости проникновения частиц от размера.

Однако существенное отличие от случайного распределения обнаружено при анализе изображений наноматов, полученных ЭП с газофазной нейтрализацией. Как следует из рис. 14 Е, полулогарифмические графики распределения фракций пор как функции их размеров заметно отклоняются от линейности, а само распределение может быть аппроксимировано эмпирической функцией:

$$\ln [p(d)] = -k_1d - k_2d^2 \quad (1)$$

Нелинейность, описываемая параметром k_2 , приводит к уменьшению доли более крупных пор в $\exp(-k_2d^2)$ раз. Так, со значением $k_2 \sim 3 \times 10^{-6}$ нм⁻², характерным для распределения на рис. 8Е, число пор, проникаемых для частиц диаметром 1 мкм, будет на 95% меньше, чем было бы в отсутствие нелинейности.

Отклонение от случайного в распределении размеров пор объясняет пороговый характер проникновения наноаэрозольных частиц в наноматах, полученных ЭП с газофазной нейтрализацией, который также был обнаружен при получении наноматов из ПВП [82].

Преимущественное осаждение заряженных нановолокон в свободном пространстве между имеющимися волокнами может быть результатом действия сильного локального электрического поля в самой поре. В противоположность наноматам, получаемым на металлической подложке, в наноматах, изготовленных с нейтрализацией облаком противоположно заряженных ионов, существует механизм залечивания больших пор, заключающийся в электростатическом притяжении заряженных волокон и противоположно заряженных ионов, которые создают электростатический потенциал в порах большого размера. При получении же наномата на электроде (верхняя часть рис. 14) после оседания заряженных нановолокон могут быть нейтрализованы только те заряды, которые находятся в прямом контакте с металлом. Все остальные будут медленно распространяться вдоль поверхности нановолокон и через межволоконные контакты, пока не достигнут электрода. Кажется, что нановолокна, оседающие сверху формирующегося наномата, должны сохранять существенный заряд, который должен отталкивать новые волокна и направлять их в пространство поры.

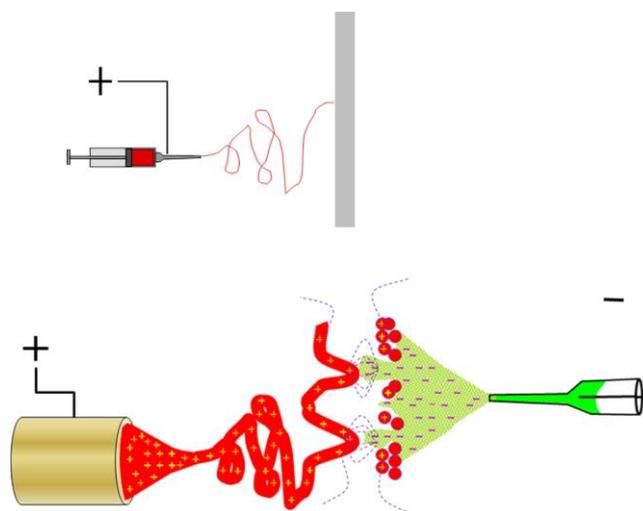


Рис. 14. Иллюстрация различных механизмов нейтрализации заряженных наноматов, образующихся при осаждении на проводящей подложке (верхняя часть схемы) и в случае газовой нейтрализации волокон (нижняя часть схемы).

В действительности, этот механизм не работает, потому что заряды в значительной степени экранированы металлом. Каждый заряд вблизи электрода образует электрическое поле (вместе с его зеркальным зарядом, как показано в нижней части рис. 14), сила которого уменьшается намного быстрее с расстоянием r по сравнению с силой изолированного заряда (r^{-3} для диполя против r^{-2} для изолированного заряда). Следовательно, появляющиеся заряженные волокна подвергаются гораздо более сильному отталкиванию от зарядов на наномате, формирующемся в отверстии, по сравнению с металлическими подложками. В дополнение к этому, в отличие от электронов электрода, противоположно заряженные ионы в газовой фазе могут проникать через образующийся

наномат, обеспечивая нейтрализацию волокон на его противоположной стороне. В результате, волокна на границе отверстия будут быстро нейтрализованы или даже противоположно заряжены маленькими противоионами, так что в пору начинают притягиваться новые заряженные нановолокна. Проникновение малых ионов может быть вызвано не только электрическим полем, но и ионным ветром [90], который сопровождает процессы электрораспыления и электропрядения. Поскольку осаждение на проводящую подложку не создаёт таких «горячих точек» и поскольку электрод экранирует заряды на поверхности наномата, нановолокна в традиционной технике электроспиннинга осаждаются случайным образом.

2.3.3. Выводы к разделу 2.3.

Преимущественное осаждение нановолокон в больших отверстиях наноматов, изготовленных методом электроспиннинга с газофазной нейтрализацией, приводит к высококачественным нанофильтрам с калиброванными порами, которые сочетают низкое проникновение аэрозольных частиц с минимальным сопротивлением воздушному потоку и минимальной плотностью полимерного материала. Такие нанофильтры могут быть использованы в различных биотехнологических приложениях. В частности, нанофильтры, изготовленные из нейлона, обладают достаточной механической прочностью и поэтому могут успешно применяться для изготовления устройств как для фильтрации водных растворов, так и для сбора образцов воздуха. Уникальные характеристики делают такие нанофильтры пригодными для сбора биологических микро- и наноаэрозолей, создания миниатюрных защитных устройств, таких как назальные фильтры, изготовления каркасов для выращивания тканевых имплантов и многих других применений. Эффективность использования нейлоновых нанофильтров в биомедицинских целях показана в следующем разделе.

2.4. Использование ультрачувствительного иммуноанализа для бесконтактной диагностики туберкулёза по выдыхаемому воздуху

Предложен принцип исследования, направленный на развитие неинвазивной диагностики инфекционных лёгочных заболеваний на примере туберкулёза легких, основанной на анализе биомаркеров туберкулёза в выдыхаемых микрокаплях лёгочной жидкости. Образцы собирали на нейлоновых нанофильтрах и затем проверяли на наличие белковых биомаркеров - секретируемых антигенов *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* и антиген-специфических антител с использованием быстрого ультрачувствительного иммуноанализа. Разработанный неинвазивный и быстрый метод диагностики лёгочных заболеваний по выдыхаемому воздуху может оказаться весьма перспективным для медицинской биотехнологии.

Для выявления изменений в ткани лёгкого при лёгочных заболеваниях обычно применяются традиционные методы лучевой диагностики, ультразвуковое исследование и ЯМР-визуализация. Однако они не могут уловить начало заболевания на ранних стадиях, когда серьёзного физического повреждения ткани лёгкого не наблюдается. В то же время для молекулярной диагностики нужны образцы лёгочной ткани, которые получают путём биопсии, или жидкости из лёгкого в процессе бронхоальвеолярного лаважа. Обе процедуры инвазивны, требуют наличия сертифицированных врачей и не могут использоваться для сбора образцов для скрининга больших групп населения. Диагностика легочных инфекционных заболеваний по биомаркерам, содержащимся в выдыхаемом воздухе имеет значительное преимущество, однако она критически зависит от метода сбора и от способности аналитических методов обнаруживать следовые количества маркеров в пробах. Потребность в простых неинвазивных методах сбора лёгочной жидкости давно признана, и было разработано несколько подходов. Некоторые ценные биомаркеры являются летучими, и они могут быть проанализированы с помощью газовой хроматографии или масс-спектрометрии [91], с помощью газовых датчиков (так называемых «электронных носов») [92] и др. Тем не менее, большинство интересных биомаркеров (белки, ДНК, РНК и т. д.) нелетучи и удаляются из лёгких не в виде паров, а в виде микрокапель субмикронных размеров [93].

Известно, что многие случаи лёгочной формы туберкулёза остаются недиагностированными [94]. Туберкулёз лёгких (ТБ) передается в основном в виде микрокапель при кашле заражённого человека [95]. Обнаружение в них биомаркеров обеспечивает потенциальную возможность ранней диагностики болезни до появления симптомов. Микрокапли и их сухие остатки могут быть собраны с использованием различных методов, таких как конденсация водяного пара на каплях, выступающих в качестве зародышей (сбор конденсата выдыхаемого воздуха) [96], с помощью импактора [97], электростатического осаждения сухих остатков [98] или фильтрации выдыхаемого воздуха [99]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Сравнение этих методов представлено в нашем обзоре [100], в котором показано, что фильтрация обеспечивает наиболее удобный и экономичный способ сбора образцов выдыхаемого воздуха с помощью дешёвых одноразовых устройств. При сборе выдыхаемых микрокапель на коммерческих фильтрах [101] возникают две проблемы: (i) затруднённое дыхание и (ii) смыв собранного материала с фильтра минимальным объёмом жидкости. Последнее особенно важно при сборе из-за малого количества нелетучего материала (0,1–1 нг на литр выдыхаемого воздуха [97]). Разработанные в нашей лаборатории бездефектные нанофильтры, описанные выше, позволяют легко дышать и способны собирать наноаэрозольные частицы размером больше 100 нм. Каждый нанофильтр изготовлен из небольшого количества нейлона (~ 2 мкг /см²) и может быть легко промыт 10–100 мкл воды. Использование активного метода проведения иммуноанализа позволяет сократить

время анализа до нескольких минут [102] при сохранении ультравысокой чувствительности и специфичности. В данном исследовании проведен анализ некоторых антигенов и ТБ-специфических антител, содержащихся в выдыхаемом больными воздухе. Таким образом, данный подход предоставляет возможность для разработки нового неинвазивного метода диагностики туберкулёза лёгких.

2.4.1. Характеристика больных с туберкулёзом и добровольцев, участвовавших в эксперименте

Данное исследование было одобрено ИРБ №1 Центрального научно-исследовательского института по туберкулёзу (ЦНИИТ, Москва, Россия), выполнено в течение 2016–2018 г.г. и проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. В исследовании участвовали 42 пациента с недавним и хроническим туберкулёзом лёгких (табл. 2), которые проходили лечение в ЦНИИТе и дали письменное согласие. Диагноз основывался на клинических и рентгенологических признаках туберкулёза, на выявлении ДНК *Mtb* и / или *Mtb* в мокроте (n = 38) или на положительных клинических и радиологических ответах на противотуберкулёзную терапию (оценивалось через 2 месяца после лечения независимыми клиницистами). Тяжесть заболевания оценивали по степени лёгочной деструкции (наличие, количество и размер очагов поражения) и количеству выделяемых бактерий на основе клеток *Mtb* и / или ДНК *Mtb* в мокроте, как описано в [103]. Сбор проб, описание больных, проведение ПЦР на содержание выделенной из бактерий ДНК, а также самих клеток выполнялись в ЦНИИТ-е рентгенологами, микробиологами и врачами, не осведомлёнными о результатах иммуноанализа выдыхаемого воздуха.

Таблица 2. Характеристика больных туберкулёзом и добровольцев, участвовавших в эксперименте.

Характеристика	Больные туберкулёзом	Здоровые добровольцы
Средний возраст, г.г. (диапазон)	35 (23–62)	45 (27–70)
Женщины	13 (31%)	6 (46%)
Недавно диагностированный (необработанный)	11 (26%)	N / A
Недавно диагностированный (обработанный)	7 (17%)	N / A
Хронический туберкулёз	23 (55%)	N / A
Форма клинического туберкулёза:		
Туберкулёз	2 (5%)	N / A
Туберкулёзный инфильтрат	15 (35%)	N / A

Туберкулёз полости рта	7 (17%)	N / A
Распространенный туберкулёз	4 (9%)	N / A
Казеозная пневмония	2 (5%)	N / A
Цирротический туберкулёз	12 (29%)	N / A
<i>Mtb</i> в мокроте:		
Положительный мазок мокроты	25	N / A
Положительные результаты (ВАСТЕС)	10	N / A
Положительная ДНК <i>Mtb</i>	3	N / A
Всего	42	13

Группа здоровых добровольцев состояла из 13 участников. Шесть доноров были сотрудниками противотуберкулёзного диспансера, которые имели отрицательный тест Quanti-FERON®-TB Gold In-Tube и не имели никаких признаков болезни. Остальные добровольцы были сотрудниками ИТЭБ РАН. Собранные образцы исследовали по протоколу двойного слепого анализа, чтобы ни лабораторный персонал, ни сотрудники, выполняющие иммуноанализ, не знали, к какой группе принадлежал образец. Точно также врачи, контролирующие сбор, не знали о результатах иммунохимического анализа.

2.4.2. Проведение иммуноанализа и статистическая обработка данных

Образцы выдыхаемых микрокапель лёгочной жидкости собирали с использованием одноразового фильтрующего блока, схематично показанного на рис. 15А.

А



Б



В



Рис. 15. Устройство, используемое для сбора выдыхаемых МЛЖ на нейлоновых фильтрах. (А) Конструкция держателя фильтра, изготовленного на 3D-принтере. (Б) Собранный прибор, состоящий из коммерческого респиратора и двух фильтров. (В) Сбор образца добровольцем.

Держатели фильтров изготавливали из полимера ABS на 3D-принтере. Каждый держатель состоял из двух колпачков с решёткой на одной стороне и отверстием на другой. Нейлоновый нанофильтр помещали между двумя частями сетки из полиэфирной ткани и зажимали между решётками двух крышек (рис. 15А). Каждый собранный блок проверяли на целостность и эффективность. В работе использовали только фильтры, которые задерживали не менее 95% частиц размером 0,3 мкм. Держатели прикрепляли к Т-образной трубке, соединённой с выходом промышленной респираторной маски УК-2 (ООО «Унона», Кинешма, Россия). Респиратор задерживал более 99% аэрозольных частиц, содержащихся во вдыхаемом воздухе, и был снабжён двумя клапанами для вдыхаемого и выдыхаемого воздуха. Общее время сбора образца составляло 10 мин. Затем пациент помещал устройство в герметичный пакет и передавал врачу. Подготовку образцов для иммуноанализа проводили сотрудники ЦНИИТ. Нейлоновый фильтр помещали в 1 мл раствора, содержащего 1% трегалозы и 0,01 мас. % Твин-20, после перемешивания на вортексе в течение 5 мин, раствор переносили в пробирки с 0,22 мкм фильтром (Corning® Costar® Spin-X®) и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 2–3 мин. Отфильтрованный образец дезинфицировали УФ-облучением в течение 30 мин, помещали в стерильный пакет и хранили при -20 °С.

Для изготовления микрочипов использовали диализную мембрану, активированную в плазменном разряде, как описано ранее. Дизайн микрочипа для анализа IgA показан на рис. 17А. Он включает зону иммобилизованных ESAT-6 и Pstс1, зону поликлональных антител, специфичных к h-IgA или h-IgG, зону положительного контроля (три зоны h-IgA) и одну зону отрицательного контроля (Ova). Микрочип для анализа на антиген туберкулёза, содержит зону моноклональных антител против Pstс1 и анти-ESAT-6 и зоны антигенов Pstс1 и ESAT-6 в качестве положительных контролей. Основная процедура проведения иммуноанализа в активном режиме описана в предыдущих главах. После сбора аналитов за 5–7 мин суспензию МЧ, покрытых поликлональными антителами против иммуноглобулина человека (h-IgA) (для анализа иммуноглобулина) или с антителами против Pstс1 и анти-ESAT-6 (для анализа туберкулёзного антигена), прокачивали через канал с расположенным под микрочипом магнитом. Изображения связавшихся магнитных частиц в 12–15 зонах, видимых в канале, регистрировали камерой.

Для оценки количества антиген-специфических антител в общем пуле использовали серию разведений образца. Связав самое низкое разведение, при котором появлялся сигнал в зоне антигена, с разведением, при котором начинали проявляться зоны с h-IgA, оценивали долю специфических антител.

Для статистического анализа данные представлены в виде медианы и межквартильных диапазонов. В связи с большим разбросом данных, особую важность приобретает статистическая обработка результатов. Для определения взаимосвязи между четырьмя проявлениями туберкулёза

(клиническая форма туберкулёза, экскреция бактерий, степень туберкулёза, повреждение лёгких) и количествами ESAT-6- и PstS1-специфических антител в промывочных растворах использовали корреляционный анализ, а именно ранговую корреляцию Спирмена со скорректированным методом Бенджамини-Хохберга [104]. Работа выполнялась совместно с сотрудниками ЦНИИТ и подробно описана в совместной публикации [103].

Системы иммунодетекции для каждого анализируемого вещества (ESAT-6, PstS1, общий IgA и IgG, специфичные для ESAT-6 и PstS1) тестировали на однокомпонентных микрочипах. Полученные ПрО представлены в табл. 3. Тест-системы для антиген-специфических иммуноглобулинов против ТБ оценивали с помощью моноклональных антител к ESAT-6 и PstS1 и магнитных частиц, покрытых поликлональными антителами против антител мыши (m-IgG). Возможность использования моноклональных m-IgG вместо h-IgA было подтверждено в предыдущей работе. В модельных экспериментах значения ПрО моноклональных антител, специфичных к ESAT-6 и PstS1, достигли 0,1 фг/мл. Такие значения соответствуют $\sim 10^3$ молекулам иммуноглобулина в образце объёмом 500 мкл.

2.4.3. Тестирование образцов, взятых у пациентов и здоровых добровольцев

Для анализа образцов выдыхаемого воздуха, собранных на фильтрах, использовали метод активного иммуноанализа. Поскольку антиген-специфический h-IgG не был обнаружен ни в первой десятке образцов больных ТБ, ни в пяти образцах добровольцев, у которых не было признаков заболевания (табл. 4), этот биомаркер был исключён из дальнейшего рассмотрения.

Таблица 3. Результаты иммуноанализа больных туберкулёзом лёгких и добровольцев.

Биомаркер	Зонд на микрочипе	Детектирующее антитело на микрочипах	ПрО, фг/образец (500 мкл)	Добровольцы (контроль) ^{а,б}	Больные ТБ ^{а,б}
ESAT-6	Моноклон. анти-ESAT-6	Поликлон. анти-ESAT-6	10	0/13	0/42
PstS1	Моноклон. анти-PstS1	Поликлон. анти-PstS1	10	0/13	0/42
Общий IgA	Поликлон. анти-h-IgA ^е	Поликлон. анти-h-IgA	1	12/13 (495; 80-1200)	38/42 (200; 10-1000)
Общий IgG	Поликлон. анти-h-IgG	Поликлон. анти-h-IgG	1	0/5	0/10
Анти-ESAT-6 IgA	ESAT-6	Поликлон. анти-h-IgA	1	3/13 (51; 40-60)	14/42 (6.5; 0.2-55)
Анти-PstS1 IgA	PstS1	Поликлон. анти-h-IgA	1	5/13 (40; 3-170)	23/42 (8.5; 0.7-90)
Анти-ESAT-6 IgG	ESAT-6	Поликлон. анти-h-IgG	1	0/5	0/10
Анти-PstS1 IgG	PstS1	Поликлон. анти-h-IgG	1	0/5	0/10

^aЧислитель - количество образцов, содержащих биомаркер выше ПрО антиген-специфических иммуноглобулинов, знаменатель - общее количество протестированных образцов.

^bВ скобках представлены медианные значения сигнала (в фг/образец) и значения сигнала для диапазона от 5% до 95%.

Для иммуноанализа были изготовлены два типа многокомпонентных микрочипов: первый - для одновременного обнаружения общего и специфического IgA (дизайн представлен на рис. 16 (А)), второй - для обнаружения антигенов ESAT-6 и Pstс1. Последний включал зоны моноклональных антител против Pstс1 и анти-ESAT-6, а также зоны антигенов Pstс1 и ESAT-6, используемых в качестве положительных контролей. Используя микрочип с дизайном, представленным на рис. 16А, и применяя процедуру титрования были оценены абсолютные количества общих IgA и антител, специфичных к каждому из секретируемых антигенов. Примеры изображений микрочипов с зонами, декорированными магнитными частицами, показаны на рис. 16Б-Г. Как видно на изображениях, антитела к секретируемым микобактериальным антигенам легко обнаруживаются, даже когда их количество в образце составляет 4×10^4 молекул.

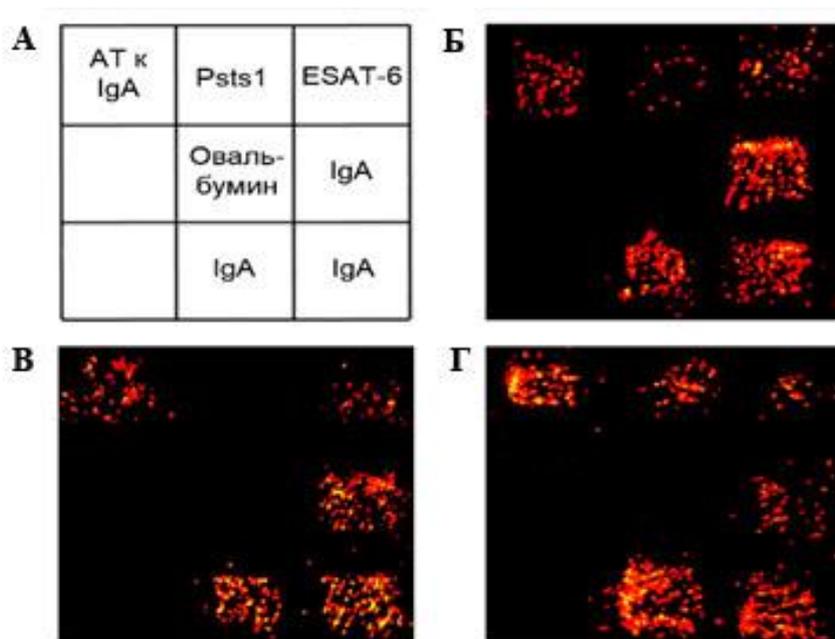


Рис. 16. Примеры анализа выдыхаемых биомаркеров в образце, взятом у пациента с туберкулёзом лёгких. (А) Дизайн микрочипа. (Б) - (Г). Изображения МЧ с антителами, специфичными к h-IgA, после электрофоретического сбора молекул IgA из образца. Содержание IgA в образцах: (Б), 0,03 - 0,1 пг общего IgA, 3 фг IgA против ESAT-6 и <0,1 фг IgA против Pstс1; (В), 1,0 мкг общего IgA, 30 мкг анти-ESAT-6 IgA и 8 мкг анти-Pstс1 IgA; (Г), 1,7 пг общего IgA, 20 фг анти-ESAT-6 IgA, 130 фг анти-Pstс1 IgA.

Образцы выдыхаемого воздуха, собранные у больных туберкулёзом пациентов, впервые были проанализированы также на наличие живых клеток *Mtb* и на присутствие ДНК *Mtb*

(выполнено в ЦНИИТе). Ни в одном из 42 образцов *Mtb* или ДНК *Mtb* не были обнаружены, что указывает на полное отсутствие живых клеток и отсутствие фрагментов ДНК выше уровня ПрО, который, по оценкам, составляет ~ 10 КОЕ. Также иммуноанализ не выявил в образцах самих антигенов ESAT-6 или PstS1. Принимая во внимание значения ПрО, можно заключить, что уровни антигенов ESAT-6 и PstS1 в собранных образцах были ниже 10 фг. Приступая к оценке ESAT-6- и PstS1-специфических антител, в качестве первого шага оценивали «качество» образца путём измерения содержания общего количества IgA. Низкий уровень IgA считался признаком несоответствующего (плохого) сбора образца, что могло быть вызвано неплотным прилеганием маски к лицу пациента, другими техническими причинами или низкой индивидуальной продукцией микрокапель выдыхаемой жидкости. В десяти (из 42) пробах, собранных у больных туберкулёзом, IgA не был обнаружен или присутствовал в количествах <40 фг (см. табл. 4). Эти десять образцов были исключены из дальнейшего рассмотрения. Из 32 образцов, взятых для анализа, которые содержали более 40 фг общего IgA, антитела против ESAT-6 были обнаружены у 14 (44%; порог для положительного результата установлен на уровне > 1фг), а антитела против PstS1 были обнаружены у 22 человек (69%). Антитела к PstS1 были также выявлены примерно в половине образцов, содержащих анти-ESAT-6 (13 из 23 пациентов).

Таблица 4. Характеристика больных туберкулёзом, которые принимали участие в исследовании, и количества антител в образцах, собранных в течение 10 мин.

№	Картина туберкулёза				Количество антител (фг/образец) ^б		
	Клиническая форма ТБ ^а	Степень выделения бактерий	Степень ТБ	Степень разрушения лёгких	Общий IgA ^б	Анти-ESAT-6 ^г	Анти-PSTSI ^г
1	4	5	4	1	100-1000	10-100 (37 ^е)	10-100 (33 ^е)
2	3	4	1	4	100-1000	1-10 (5 ^д)	10-100 (44 ^е)
3	4	3	3	3	100-1000	10-100 (14 ^е)	10-100 (13 ^е)
4	3	3	2	4	100-1000	1-10 (4 ^д)	10-100 (46 ^е)
5	3	5	2	3	1000-10000	1-10 (8 ^д)	10-100 (10 ^е)
6	6	5	4	4	1000-10000	10-100 (55 ^е)	10-100 (26 ^е)
7	6	5	3	4	100-1000	10-100 (20 ^е)	1-10 (7 ^д)
8	6	5	4	2	250	0	0
9	6	5	2	4	300	0	0
10	2	4	3	4	990	30	8
11	2	2	2	1	1700	20	130

12	6	5	2	1	0	0	0
13	3	5	1	2	1400	25	90
14	2	5	2	2	650	0	17
15	3	2	3	3	400	0	0
16	2	2	3	3	100-300	0	0
17	6	5	2	4	300-1000	0	0,7
18	6	2	2	3	10-30	0	0
19	6	2	4	3	300- 1000	0,5	9
20	3	4	1	2	100-300	0	5
21	2	3	2	1	30-100	0,3	7
22	2	3	2	3	30-100	3	0
23	2	2	3	1	10-30	0	0
24	5	1	3	3	30-100	0	0
25	6	5	2	2	10-30	0	0
26	2	1	2	2	0	0	0
27	6	5	3	4	300-1000	0,5	0,4
28	2	2	1	1	10-30	0	0
29	2	4	2	4	300-1000	10	15
30	1	3	2	3	10-30	0	0
31	6	5	3	4	0	0	0
32	2	2	3	1	100-300	2	1
33	4	4	4	4	100-300	0	1
34	2	2	2	1	100-300	0	
35	4	5	3	4	30-100	1	6
36	2	2	1	3	0	0	0
37	3	2	3	4	100-300	0	12
38	5	1	2	2	30-100	0	4
39	1	1	1	1	100-300	0	0
40	2	1	2	1	100-300	0,2	7
41	2	1	1	1	10-30	0	0
42	6	2	1	3	100-300	0	3

Примечания:

^aКлинические формы туберкулёза: 1 - ТБ, 2 - инфильтрат туберкулёза, 3 - ТБ полости рта, 4 - диссеминированный ТБ, 5 - казеозная пневмония, 6 - цирротический ТБ.

^б Объём образца – 500 мкл.

^в Образцы с количествами IgA, превышающими 40 фг, выделены жирным шрифтом

^г Образцы (анти-ESAT-6 и анти-PstS1) с концентрациями антиген-специфических антител, превышающими 1 фг, считающиеся положительными, выделены жирным шрифтом.

^{д,е} При концентрации антител от 1 до 100 фг значения, использованные в корреляционном анализе (показаны в скобках), получали с использованием генератора случайных чисел.

Для контроля образцы участников без признаков заболевания были проанализированы на присутствие ТБ-специфических антител. В общей сложности в исследование были включены 13 добровольцев (пять из них имели контакты с туберкулёзными больными, но не имели признаков болезни и имели отрицательный тест QuantiFERON®-TB Gold In-Tube). Контрольные образцы собирали с помощью описанных одноразовых фильтрующих элементов. Результаты анализа контрольных образцов приведены в табл. 5.

Таблица 5. Результаты анализа по определению общего IgA и IgA, специфичного к микобактериальным антигенам, у добровольцев.

Образец	IgA, фг/образец	анти-ESAT-IgA, фг/образец	анти-PstS1-IgA, фг/образец	Волонтёры
1	530	51	35	ИТЭБ РАН
2	80	0	0	ИТЭБ РАН
3	140	0	0	ИТЭБ РАН
4	750	0	0	ИТЭБ РАН
5	460	0	3	ИТЭБ РАН
6	940	40	170	ИТЭБ РАН
7	300	0	0	ИТЭБ РАН
8	0	0	0	ЦНИИТ
9	160	0	12	ЦНИИТ
10	700	0	0	ЦНИИТ
11	750	60	40	ЦНИИТ
12	1200	0	0	ЦНИИТ
13	1000	0	0	ЦНИИТ

Для проверки воспроизводимости результатов у шести добровольцев в течение 3-5 месяцев были собраны и проанализированы повторные пробы. В каждом сеансе сбора получали два образца фильтров, которые обрабатывали независимо. Полученные результаты представлены в табл. 6. За исключением одного случая, IgA был обнаружен во всех собранных пробах. Из 12

образцов, проанализированных на ТБ-специфические антитела, анти-ESAT-6 выявлен у 3 (25%) и анти-PstS1 - у 5 (42%) пациентов.

Таблица 6. Результат повторных измерений антиген-специфичных иммуноглобулинов в образцах, полученных у добровольцев (ИТЭБ РАН).

Образец ^а	Первый фильтр			Второй фильтр			Волонтеры (ИТЭБ РАН)
	IgA, фг	Anti-ESAT-IgA, фг	Anti-PstS1-IgA, фг	IgA, фг	Anti-ESAT-IgA, фг	Anti-PstS1-IgA, фг	
1	530	51	35	430	0	40	1
2	300	0	0	570	0	60	1
3	80	0	0	110	0	0	2
4	290	0	0	120	0	0	2
5	140	0	0	260	0	0	3
6	630	0	0	290	0	0	3
7	750	0	0	70	0	0	4
8	1000	0	0	110	0	0	4
9	460	0	3	1300		0	5
10	270	0	15	1100	0	0	5
11	940	40	170	800	30	110	6
12	170	0	64	670	20	80	6

У двоих участников были обнаружены антиген-специфические антитела, несмотря на некоторые колебания в общем количестве IgA, которое варьировало от 170 фг до 940 фг. У одного добровольца с низким уровнем специфических антител такие антитела не были найдены и при повторном анализе. Несмотря на высокую вариабельность количества собранных антител, эти тесты продемонстрировали надёжность анализа. Принимая во внимание только образцы, собранные у 32 пациентов и 12 добровольцев с уровнем общего IgA выше 40 фг, рассчитанные значения диагностической чувствительности и специфичности составляют 72% и 58% соответственно (для присутствия по крайней мере одних ТБ-специфических антител). Конечно, эти данные следует рассматривать как приблизительные оценки, принимая во внимание ограниченное число пациентов и добровольцев, вовлечённых в пилотное исследование.

Оценка количества ТБ-специфичных антител выявила высокую вариабельность их содержания между пациентами (табл. 4). Возникает вопрос, можно ли объяснить эту изменчивость разнообразием заболевания у зарегистрированных больных. Чтобы на него ответить, была проанализирована корреляция между тяжестью заболевания и количеством ESAT-6- и PstS1-специфических антител, обнаруженных в смывных пробах. Тяжесть ТБ оценивали по следующим

проявлениям болезни: (i) клиническая форма ТБ, (ii) уровень бактериального выделения, (iii) степень поражения лёгких и (iv) степень ТБ. Для оценки проявлений ТБ использовали разработанную систему оценок [105, 106]. Для корреляционного анализа были отобраны 32 пациента с уровнем IgA выше 40 фг. Как показано в табл. 7, единственная корреляция, найденная с помощью анализа Спирмена, обнаружена между титрами анти-ESAT-6 IgA и степенью экскреции бактерий ($r = 0,37$, $p = 0,04$). Однако процедура Бенджамина – Хохберга привела к незначительной корреляции (порог значимости, $p = 0,006$). Эти результаты можно интерпретировать как устойчивую тенденцию к установлению взаимосвязи между концентрацией антител против ТБ в выдыхаемом воздухе и количеством микобактерий в лёгких. Предположительный характер корреляции связан, в первую очередь, с относительно небольшим числом включённых в анализ пациентов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить или опровергнуть данную корреляцию.

Таблица 7. Корреляции между проявлениями ТБ и количеством антиген-специфических антител IgA в образцах выдыхаемого воздуха.

Выборка	Положительный результат ^a , число пациентов, (%)		Корреляционный анализ Спирмена ^b			
	Добровольцы	Больные ТБ	Клиническая форма	Выделение бактерий	Степень ТБ	Повреждение лёгких
Анти-ESAT-6 IgA	3 (25%)	14 (44%)	$\rho = -0,05$ $p = 0,77$	$\rho = 0,37$ $p = 0,04^b$	$\rho = 0,15$ $p = 0,43$	$\rho = 0,10$ $p = 0,57$
Анти-PstS1 IgA	5 (42%)	23 (72%)	$\rho = -0,11$ $p = 0,53$	$\rho = 0,23$ $p = 0,20$	$\rho = -0,12$ $p = 0,53$	$\rho = -0,02$ $p = 0,91$

Примечания:

^aЧисло и процент пациентов и добровольцев, показывающих уровень биомаркеров выше ПрО.

^bТолько пациенты (32) и добровольцы (12) с уровнем общего IgA выше 40 фг/образец учитывались в анализе Спирмена.

^b p -значение $< 0,05$, но корреляция в анализе Бенджамина-Хохберга незначительна (скорректированное значение $p = 0,006$).

Насколько нам известно, мы впервые проанализировали выдыхаемый воздух отдельных пациентов на наличие молекул антител к туберкулёзным антигенам и на предмет их специфичности к патогенам. Это стало возможным благодаря объединению двух уникальных технологий: электропрядения для производства высокоэффективных бездефектных наночистот и ультрачувствительного иммуноанализа на основе микрочипов с применением магнитных меток. ПрО специфических антител в образце 500 мкл достигает 1 фг, что эквивалентно ~4000 молекулам

IgA ($M_w = 170$ кДа). Для секретируемых микобактериальных антигенов предел оказался выше, 3 фг/мл, что эквивалентно 24 000 молекул PstS1 ($M_w = 38$ кДа). Однако не во всех образцах, взятых у пациентов с ТБ, были выявлены антитела IgA и ТБ-специфичные антитела. Одной из чисто технических причин может быть плохая подгонка маски к лицу пациента. Другой причиной плохого сбора может быть известная изменчивость количества выдыхаемых капель [107]. Как видно из представленных данных, использование двух биомаркеров туберкулёзной инфекции не смогло провести различие между больными пациентами и добровольцами, имевшими контакты с инфицированными людьми. Очевидно, что для повышения специфичности и чувствительности метода следует привлечь другие биомаркеры. К сожалению, ни микобактериальные антигены (ESAT-6 и PstS1), ни микобактериальные ДНК не были обнаружены в образцах пациентов. Если они и присутствовали, то их концентрации были определённо ниже ПрО. Хотя ПЦР-анализ обнаружил микобактериальную ДНК у 70% больных ТБ [108], необходимо помнить об очень низком содержании материала в собранных выдыхаемых микрокаплях. Так, общее количество белка в 100 мл бронхоальвеолярного лаважа оценивается примерно в 6 ± 1 мг [108], что в миллион раз больше, чем общее количество твёрдой массы, собранной из выдыхаемого воздуха за 10 мин сбора [98]. Очевидно, что подобное снижение содержания ДНК не позволит определить её даже с помощью ПЦР. Аналогичным образом можно объяснить нашу неспособность обнаружить в выдыхаемых образцах антигены ESAT-6 и PstS1. Есть надежда, что параллельное выявление ТБ-специфических антител и биомаркеров воспаления повысит специфичность и чувствительность анализа. Кандидатами на такие дополнительные биомаркёры могут стать интерлейкины IL-1, IL-4 и IL-13, так как их концентрация в бронхоальвеолярном лаваже у больных ТБ в сто раз выше, чем у здоровых людей [109].

Надо рассмотреть еще один вопрос: насколько репрезентативен состав выдыхаемых микрокапель? Достоверные оценки количества нелетучих материалов, собранных в течение 10 мин, для большинства людей составляют 1–10 нг [110, 111]. Очевидно, что каждый биомаркёр будет составлять лишь небольшую часть этого количества, и поэтому для обнаружения конкретных биомаркеров в собранных пробах требуются чрезвычайно чувствительные методы. Учитывая, что белки составляют 10% от общей сухой массы капель [111] и представляющие интерес биомаркеры не входят в число «домашних» белков, можно сделать вывод, что ПрО должен составлять не менее 1/10 000 от всего нелетучего материала, или менее 100 фг. Для типичного белка с молекулярной массой 100 кДа это означает, что в пробе должно содержаться, по крайней мере, 10^{-18} моль или 6×10^5 молекул. При типичном объёме пробы 0,1 мл концентрация биомаркера будет около 10^{-14} М, что намного меньше, чем константа диссоциации, K_d , любого известного антитела. Это означает, что все обычные форматы иммуноанализа, такие как ИФА, анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса и т.д., оказываются непригодными. Есть еще одна

проблема. Обычно для поиска биомаркеров на практике использовали как цельные пробы, собранные одним человеком, так и комбинированный образец, собранный несколькими добровольцами, как делают в протеомном анализе конденсата выдыхаемого воздуха. Основным недостатком такого подхода к анализу выдыхаемого воздуха является разбавление биомаркеров из ограниченной зоны инфекции множеством белков из микрокапель «здорового» отдела лёгкого. А многочисленные примесные вещества могут мешать иммуноанализу и анализу биомаркеров ДНК. Такие соображения побуждают искать альтернативный подход к анализу.

2.4.4. Выводы к разделу 2.4.

Впервые продемонстрировано, что 10-минутный сбор микрокапель лёгочной жидкости на фильтре с последующим ультрачувствительным обнаружением антител, специфичных к микобактериальным секретлируемым антигенам, выявил такие антитела не у всех, но у многих пациентов с туберкулёзом лёгких. Дальнейшее развитие процедуры сбора и расширение списка маркеров с включением интерлейкинов в качестве воспалительного фактора, а также других биомаркеров, поможет отделить пассивных носителей туберкулёзной инфекции от больных пациентов и повысить специфичность анализа и его чувствительность. Усовершенствование приспособлений, используемых для сбора, и методов анализа являются основными тенденциями в развитии диагностики по выдыхаемому воздуху. Развитие неинвазивной диагностики заболеваний лёгких является ярким примером действительно междисциплинарных исследований. Как только многочисленные технологические проблемы будут решены, мы сможем получить новый инструмент для диагностики инфекционных заболеваний лёгких, которые позволят проводить скрининг среди больших групп населения и оценивать воздействие загрязнений на окружающую среду и здоровье человека.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК

Разрабатываемые методы мультиплексного анализа ДНК, белков и антигенов основаны на использовании микрочипов собственного изготовления. По этой технологии для иммобилизации зондов на поверхности подложки применяется процесс электрораспыления, позволяющий получать до нескольких тысяч чипов на площади в несколько мм с диаметром рабочих зон около 100 мкм. Однако, как отмечалось в литературе, в процессе ЭР могут происходить некоторые повреждения биомакромолекул под действием различных факторов, требующих изучения их роли в каждом конкретном случае.

3.1. Изучение генерации активных форм кислорода в процессе электрораспыления

Электрогидродинамическое распыление широко используется в качестве метода для мягкой ионизации молекул [112], для осаждения биомолекул при использовании сканирующей зондовой микроскопии [113-115], при изготовлении микрочипов [116-118], плёнок из белка [47, 119], образцов для MALDI MS [120], для генерации биологических наноаэрозолей [86, 121]. Во всех этих приложениях сохранение молекулярной целостности и функциональных свойств биологических молекул имеет большое значение. Однако, несмотря на мягкий характер ЭР, в спектрах генерируемых белковых ионов могут наблюдаться окисленные формы [122, 123], фрагментация электрораспыляемых пептидов [124, 125] и олигонуклеотидов [126], а также инактивация ферментов [119, 127]. Такие эффекты могут быть вызваны рядом причин. Например, легко окисляемые молекулы могут быть превращены в катион-радикалы в результате электрохимической реакции на электроде [128]. В общем случае, в ходе электрораспыления наблюдаются сильное течение в конусе Тейлора [129], изменения pH в образующихся каплях [130], неконтролируемое обезвоживание образцов [127], которое может приводить к денатурации молекул биополимеров. Тем не менее, в большинстве опубликованных исследований по фрагментации пептидов [125] и окислению белков [123] основным повреждающим фактором считается коронный разряд, который сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК) и свободных электронов [131]. Коронный разряд при ЭР был отмечен во многих исследованиях [132-135], однако токи, используемые в этих экспериментах, были довольно высокими (до 1 мкА). Возникает вопрос: может ли появляться коронный разряд при ЭР воды и других растворителей из стеклянных капилляров при относительно низких токах, используемых в наших приложениях, и может ли такой разряд вызывать АФК. Ранее в нашей лаборатории было показано [101], что при токах ниже 150–200 нА щелочная фосфатаза, распылённая из стеклянного капилляра при положительном потенциале, сохраняет 100% специфической ферментативной

активности. Наблюдаемое падение активности фермента при более высоких токах было объяснено возникающим коронным разрядом, хотя в то время не было прямых данных, подтверждающих этот факт. Бойс и др. [123] при токах выше > 100 нА обнаружили заметное окисление β -гемоглобина, которое объяснили образованием АФК в коронном разряде. Краснов с соавт. [136] зарегистрировали появление нового иона N_2H^+ в масс-спектрах электрораспылённого раствора CsCl в 50 об. %-ном метаноле при достижении тока 100 нА. Так как появление коронного разряда зависит от множества факторов (скорость потока, диаметр капилляра, напряжение, проводимость раствора, тип соли и состав газовой среды), это затрудняет сравнение результатов различных исследований. Для изготовления белковых и ДНК-микрочипов в нашей лаборатории используется метод электрогидродинамического распыления, цель данной части работы заключалась в определении количеств АФК (пероксида водорода, озона, гидроксильных радикалов, супероксид-анионов), генерируемых при ЭР при низких токах.

3.1.1. Методы определения содержания активных форм кислорода в продуктах электрораспыления

Для электрораспыления образцов использовали кварцевый капилляр с внутренним диаметром 50 мкм, вплавленный в наконечник пипетки. Напряжение подавали через платиновую проволоку, вставленную в иглу для шприца (рис. 17).

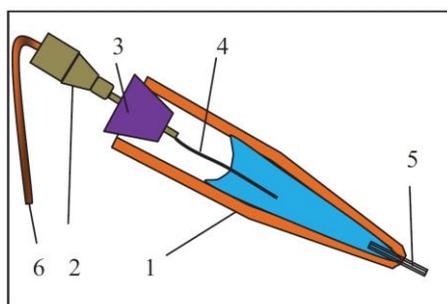


Рис. 17. Дизайн капилляра для электрораспыления: 1 - наконечник пипетки с впаянным в него кварцевым капилляром, 2 - игла, 3 – пробка из диметилсилоксана, 4 - проволока из платины, 5 – кварцевый капилляр, 6 – трубка.

Для оценки общего количества пероксида водорода, генерируемого при ЭР, через камеру прокачивали воздух со скоростью 0,5 л мин (рис. 18 (А)). Воздух рециркулировали и барботировали определенное время через 10 мл воды при интенсивном перемешивании. В контрольных экспериментах воздух прокачивали через систему в отсутствие ЭР. Во всех экспериментах воздух очищали пропусканием через древесный уголь, гопкалит и НЕРА-фильтр. Из-за низкого содержания пероксида водорода концентрацию определяли спектрофлуориметрическим методом,

основанным на ферментативном окислении реактива Ampliflu Red [137]. Для этого 1,1 мл раствора образца добавляли к равному объёму свежеприготовленной смеси, содержащей 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,4, 20 мкг пероксидазы хрена и 100 мкМ Ampliflu Red (19 мМ раствор в ДМСО). Смесь инкубировали 3–4 мин и измеряли интенсивность флуоресценции на длине волны $\lambda_{\text{em}} = 580$ нм ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ нм). Поглощение растворов измеряли на спектрофотометре SF-104 (Аквилон, Россия), флуоресценцию - на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Австралия).

Количество генерируемого H_2O_2 рассчитывали по градуировочному графику, используя $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [138]. Предел обнаружения составил 2 нМ.

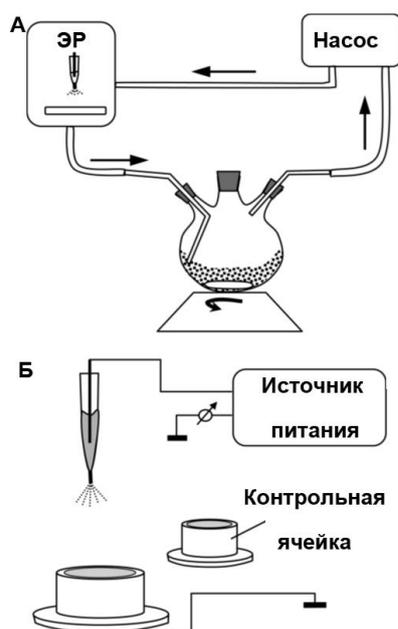


Рис. 18. (А) Схема измерения H_2O_2 и озона путем барботажной камеры. (Б) Схема экспериментов, использованных (i) для сбора окисленных продуктов TNBT и ССА в анализе супероксидных анионов и гидроксильных радикалов, (ii) для сбора электрораспыленной уреазы, (iii) при обработке растворов уреазы электрораспыленными продуктами воды и (iv) при анализе образцов на содержание озона в растворе индигокармина.

Для определения озона в колбу помещали 10 мл 28 мкМ раствора индигокармина в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7,4 [139] и через камеру в течение 3 ч продували воздух со скоростью 0,5 л /мин. Этанол (96%) электрораспыляли при положительном и отрицательном потенциале и токе 150 нА. Поглощение раствора измеряли каждый час, используя $\epsilon_{618} = 8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [140]. Концентрацию озона рассчитывали по уменьшению поглощения раствора красителя. Количество озона измеряли также по его реакции с раствором индигокармина в капле с помощью устройства, изображенного на рис. 18Б. Другая капля, расположенная поблизости, но не подключенная к источнику питания, использовалась в качестве контроля. Озонированную воду готовили с

помощью самодельного генератора озона. Генератор состоял из двух стеклянных трубок, расположенных на одной оси. Электроды на внутренней и внешней сторонах трубок подключали к высоковольтному трансформатору. После барботажа газа через воду концентрацию озона измеряли по реакции с индигокармином, и раствор немедленно использовали в экспериментах по влиянию озона на ферментативную активность уреазы.

Для оценки количества супероксидных анион-радикалов и гидроксильных радикалов 0,1 мМ раствор тетранитро синего тетразолий хлорида (TNBT) электрораспыляли при положительном потенциале в каплю ДМСО объёмом 200 мкл, к которой подводили отрицательный потенциал. Для облегчения ЭР TNBT из капилляра, находящегося при отрицательном потенциале, его растворяли в 20 об. %-ном этаноле. Электрораспыление 50 мкл раствора TNBT занимало 32 мин при положительном и 95 мин при отрицательном потенциале. Продукт восстановления TNBT полуформазан [141] определяли по изменению поглощения на $\lambda = 525$ нм, используя $\epsilon_{\text{ДМСО}} = 21\ 900\ \text{М}^{-1}\ \text{см}^{-1}$ [142]. Количество гидроксильных радикалов определяли по реакции с TNBT, приводящей к образованию флуоресцентного гидроксильированного продукта 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (НССА) [143]. Как и в предыдущем случае, краситель добавляли непосредственно в раствор до ЭР, чтобы обеспечить скорейший доступ короткоживущих радикалов к красителю. Раствор ССА, используемый при ЭР при положительном потенциале, содержал 100 мкМ ССА и 1 мМ фосфатный буфер, рН 7,4. Для облегчения распыления при отрицательном потенциале такой же раствор готовили в 30 об. %-ном этаноле (об.). Растворы ССА распыляли в каплю воды объёмом 200 мкл, находящуюся под противоположным потенциалом, как показано на рис. 18 (Б). После электрораспыления объём капли доводили водой до 1 мл и измеряли флуоресценцию на $\lambda_{\text{ex}} = 395$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 450$ нм. Калибровочный график выполняли с использованием растворов НССА, 1–10 мкМ, как описано в [143] (не показан). Рассчитанный ПрО с учётом вариаций отрицательного контроля соответствовал ~20 ммоль НССА в 0,2 мл образца.

Возможное повреждение белковых молекул при ЭР было изучено на примере уреазы и лизоцима. Раствор уреазы электрораспыляли в каплю воды, находящуюся под отрицательным потенциалом, как схематически показано на рис. 18Б. Ферментативную активность уреазы измеряли по скорости увеличения рН. Эта часть работы была выполнена сотрудником лаборатории к.ф.-м.н. А.Ю. Михеевым и описана в совместной работе [144]. Исследование лизоцима после ЭР методом MALDI MS было выполнено на масс-спектрометре ltraflex TOF / TOF (Bruker Daltonics) в ИБ РАН.

3.1.2. Определение выхода активных форм кислорода

В то время как напряжённость электрического поля существенно варьирует в зависимости от многих факторов, ток одинаков во всех цепях и определяется скоростью процесса разделения

заряда в зазоре между наконечником капилляра и противоэлектродом [145]. Поэтому обсуждение результатов проведено с точки зрения зависимости сигнала от тока, а не напряжения. Хотя реагент Apliflu Red, используемый для измерения пероксида водорода, может реагировать также с другими АФК, пероксид водорода является единственной формой, достаточно стабильной для экстракции водой и обнаружения в растворе. Однако, несмотря на простоту методики определения H_2O_2 , значения выхода в нескольких независимых экспериментах отличались в 2 раза, предположительно, из-за различий в форме кончика капилляра. Типичная концентрация пероксида водорода, определённая в 10 мл воды после пропускания через капилляр тока 150 нА в течение 20 мин (общий заряд 0,18 мК), составила 0,3–0,6 мкМ при отрицательном потенциале и ~ 0,15 мкМ при положительном. Поскольку воздух постоянно рециркулировали через камеру, большая часть образовавшегося пероксида водорода была в конечном итоге поглощена водой. Учитывая постоянную Генри $K_{\text{H}} = 1,08 \times 10^5 \text{ М/атм}$ [146], при концентрации 0,5 мкМ в растворе количество газообразного H_2O_2 , оставшегося в 2 л воздуха (объем камеры и колбы) составляла ~0,01% от количества, собранного в 10 мл воды (5 нмоль). Таким образом, газовой фракцией H_2O_2 при расчёте можно пренебречь. Для очистки воздуха его пропускали через несколько фильтров, в противном случае примеси существенно влияли на измерения H_2O_2 как непосредственно (озон всегда присутствует в окружающем воздухе), так и косвенно, изменяя выходы в цепи газофазных реакций после первичной ионизации [147]. При проведении экспериментов без очистки воздуха, выход пероксида водорода существенно изменялся в зависимости от сезона и в некоторых экспериментах достигал 60 молекул $\text{H}_2\text{O}_2/ \text{e}^-$.

Индигокармин реагирует не только с озоном, но и с супероксидными радикалами, образуя аналогичные продукты [148]. Как будет показано ниже, концентрация O_2^- пренебрежимо мала, и выцветание кармина можно отнести только к его реакции с озоном. При токе 150 нА снижение интенсивности поглощения индигокармина было ниже разрешения нашего спектрофотометра даже после 3-часового барботирования воздуха через 10 мл раствора индигокармина. Относительно низкий уровень озона может объясняться небольшим объёмом зоны выброса вокруг кончика жидкости. Аналогично, при коронном разряде на углеродных нанотрубках озон не был обнаружен [149]. Когда вода распылялась с положительного потенциала в каплю того же раствора индигокармина (рис. 18 (Б)), изменения поглощения соответствовали наномолярным количествам озона в 0,2 мл раствора. Выходы озона 0,043, 0,055 и 0,045 O_3 / e^- были получены при электрораспылении воды в трёх экспериментах при токе 200 нА. Очевидно, это минимальные значения, так как только часть озона достигала капли. Два 20-часовых эксперимента, в которых капля индигокармина поглощала продукты распыления 10 мкМ раствора KCl при токе 20 нА и положительном потенциале, привели к выходу 0,018 и 0,007 O_3 / e^- , что указывает на незначительное образование озона при слабом токе в отсутствие короны.

Никаких изменений в поглощении не было обнаружено после 32 мин ЭР раствора TNBT при положительном потенциале на капилляре. Если принять разрешение при измерении оптической плотности равным 0,005, верхний предел обнаружения O_2^- должен быть ниже 46 пмоль. Учитывая, что при токе 150 нА за 32 мин прошло 3 нмоль электронов, получается, что выход O_2^- должен быть ниже $0,02 O_2^- / e^-$ при положительном потенциале. После распыления в течение 95 мин при отрицательном потенциале увеличение поглощения было на уровне 0,007, что дает выход $O_2^-/e^- \leq 0,007$. Какую-либо разницу во флуоресценции ССА после ЭР и сбора продуктов в капле воды зарегистрировать не удалось.

Результаты оценок АФК, генерируемых при ЭР, суммированы в табл. 8. Кроме пероксида водорода, другие АФК не были обнаружены даже при сильном токе и значительной продолжительности процесса (3–5 ч). Верхние пределы выходов рассчитывали из ПрО для каждой методики. Разумеется, к выводу о низких выходах гидроксильных радикалов и супероксидных анионов следует относиться с осторожностью: эти продукты образуются в разряде вне заряженных микрокапель с реагентом, и только часть из них может достичь капли и прореагировать с ССА или TNBT, прежде чем они превратятся в менее реакционноспособный пероксид водорода. Независимо от того, произведены ли эти продукты в небольших количествах или не достигают реагента в течение срока их жизни, можно ожидать, что распыляемые вещества не должны быть заметно ими повреждены.

Таблица 8. Расчёт выходов различных АФК. Знаки «плюс» и «минус» перед значением тока обозначают знак потенциала на капилляре, из которого распыляли этанол на металлический противоэлектрод.

Продукт	Тип эксперимента	Время, мин	Ток, нА	Электр оны, нмоль	ПрО, пмоль	Выход (моль/электрон)
H_2O_2	Пробулькивание через воду (Ampliflu Red, HRP)	20 20 12	+150 -150 +250		20	0.7; 1.0; 0.5 1,4; 2.1; 2.6; 3.2 0.6
OH^*	Распыление в каплю воды с ССА	300 300	+150 -150	28 28	20	<0.001 <0.001
O_2^-	Распыление в каплю ДМСО с TNBT	32 95	+150 -150	3 8.9	46	<0.015 ≤ 0.007
O_3	Пробулькивание через р-р индигокармина	180 180	+150 -150	17 17	6,2	<0.3 <0.3

Следует ещё раз подчеркнуть, что использование очищенного воздуха должно быть обязательным условием в таких экспериментах, как и использование воды MilliQ для приготовления растворов.

Для ответа на вопрос, могут ли генерируемые АФК повлиять на распыляемые биомолекулы, было использовано несколько подходов. Анализ MALDI-MS модельного белка (лизоцим из куриных яиц) не выявил заметных модификаций или фрагментации молекул. При SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле распылённых продуктов БСА и уреазы, дополнительные полосы не были обнаружены (данные не приведены). Уреазу использовали также в качестве зонда, чувствительного к окислению [150, 151]. Известно, что уреазы медленно инактивируются даже в присутствии миллимолярных концентраций H_2O_2 [151]. Таким образом, H_2O_2 может быть исключён из списка веществ, повреждающих белки при ЭР. Озон, добавленный к раствору уреазы (10 мкг/мл) в конечных концентрациях 1,5 мкМ и 3 мкМ, уменьшил активность фермента на 50% и 80% соответственно. При этом при распылении уреазы при токе до 200 нА в течение 40 мин в присутствии 0,1 мМ ЭДТА потери активности не наблюдалось. Простой расчет показывает, что 5000 электронов не смогли инактивировать одну молекулу фермента. Учитывая, что в большинстве практических применений концентрация белка на 3–4 порядка выше, чем в наших экспериментах, маловероятно, чтобы следовые количества АФК, сопровождающие ЭР при токах ниже 200 нА, заметно повреждали распыляемые белковые молекулы. Эксперименты с уреазой выполнены к. ф.-м. н. А.Ю. Михеевым, результаты представлены в совместной публикации [144].

3.1.3. Выводы к разделу 3.1.

Показано, что электрораспыление воды и этанола из стеклянного капилляра характеризуется удивительно низкими выходами общих АФК: за исключением пероксида водорода и озона, других известных АФК обнаружено не было. Значительных повреждений белков при электрораспылении растворов с высокой концентрацией не выявлено.

3.2. Изучение механического повреждения молекул ДНК при электрогидродинамическом распылении

Хотя электрораспыление нуклеиновых кислот не является широко распространённым методом, оно используется в масс-спектрометрии [126], трансфекции генов [155], изготовлении микрочипов [116]. Генерируемые при ЭР наноаэрозоли ДНК могут стать эффективными агентами для генной терапии с селективной доставкой лекарств [86]. Процесс ЭР включает в себя события с высокой энергией, такие как (i) интенсивные потоки и вихри в конусе Тейлора [111], (ii) высокоскоростной поток в струе жидкости [161] и (iii) образование высокоэнергетических молекулярных частиц в коронном разряде, который часто сопровождает процесс [144]. Поэтому, когда биомакромолекулы подвергаются ЭР, необходимо учитывать возможность их повреждения. Что касается белков, то измерения ферментативной активности позволили нам определить условия, в которых они сохраняют свои функциональные свойства [47, 121, 144]. Однако, поскольку большие молекулы нуклеиновых кислот намного более чувствительны, чем

глобулярные белки, к сдвиговому потоку и другим механическим силам, действующим в процессе ЭР, эти условия не могут быть автоматически перенесены на ДНК и требуют специального изучения. Приведём пример. Тундат с соавторами [162] первыми применили ЭР для подготовки образцов ДНК для сканирующей туннельной микроскопии и обнаружили частичную фрагментацию плазмиды при осаждении на поверхности золота. Позднее Ченг и соавт. [126] подтвердили этот результат, показав, что компактные суперскрученные плазмиды образуют зазубренные формы. К сожалению, в литературных источниках имеются весьма ограниченные сведения о влиянии ЭР на большие линейные молекулы ДНК. Так, широкая дисперсия ионных масс наблюдалась при распылении ДНК фага λ [163]. Авторы объяснили этот факт фрагментацией молекул, но не оценили ни её степень, ни зависимость от условий ЭР. Более того, возможные изменения вторичной структуры ДНК не могли наблюдаться методами, использованными в работе. В то же время показано, что короткие линейные последовательности ДНК (<500 п. о.) не фрагментируются при ЭР [164]. Имеются данные о том, что образующиеся при ЭР активные формы кислорода способны химически модифицировать отдельные остатки сахара и оснований [165, 166], а также вызывать сильные изменения в структуре молекул нуклеиновой кислоты [167]. Гидродинамический разрыв ДНК, еще один фактор, способный повредить нуклеиновые кислоты при ЭР, также являлся предметом интенсивных исследований и моделирования [168-171]. В данной части работы проведено комплексное изучение повреждения молекул ДНК в процессе электрораспыления. Фрагментацию ДНК и структурные изменения изучали с помощью электрофореза в агарозном геле и атомно-силовой микроскопии. Ключевые факторы, влияющие на повреждение ДНК во время ЭР, были определены для линейной dsДНК фага λ длиной 50 тыс. пар оснований (п.о.), а также для её более коротких фрагментов.

3.2.1. Материалы и методы исследования

Lambda DNA/HindIII Marker и ДНК фага λ куплены у Thermo Scientific (Waltham, USA). Краситель SYBR Green I приобретён в BioDye (Россия). Хлорид гексамминкобальта (III) синтезирован, как описано в [172]. Для получения коротких фрагментов ДНК коммерческий препарат Lambda DNA/HindIII Marker разделяли электрофорезом в агарозном геле. Фрагменты 23130, 9416, 6557 и 4361 п.о. электрофоретически элюировали в буфер $1 \times$ TBE, содержащий 10 мас. % ПЭГ-200, после чего компоненты буфера удаляли диализом против воды в течение 24 ч.

Раствор ДНК распыляли из стеклянного капилляра, как описано ранее. Для сбора продуктов ЭР на расстоянии 3 см от наконечника помещали каплю воды объёмом 150 мкл, которую заземляли через платиновую проволоку. К капилляру прикладывали положительное напряжение $\sim 4 - 5$ кВ. Систему помещали в двухлитровый сосуд, заполненный воздухом, очищенным пропусканием через НЕРА-фильтр. В типичном эксперименте капилляр для распыления заполняли 20 мкл раствора ДНК с концентрацией 50 мкг/мл и подключали к микрошприцевому насосу. Для точного

контроля скорости подачи раствора шприц и соединительную трубку заполняли маслом. На протяжении всего эксперимента автоматическая система поддерживала постоянный ток 100 нА. После ЭР каплю упаривали до 10 мкл с помощью вакуумного концентратора Eppendorf Concentrator Plus (США) и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoPhotometer P330 (Implen, Германия). В некоторых экспериментах при ЭР образцов при отрицательном потенциале на капилляре в сосуд за 5 мин до начала процесса помещали кусок бумаги, пропитанный 100 мкл трифторэтанола. Трифторэтанол эффективно понижает поверхностное натяжение раствора и облегчает процесс ЭР.

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 0,4%-ном агарозном геле, приготовленном на буфере $1 \times$ TBE, в течение 1 ч при напряжении 130 В с использованием электрофоретической системы EASY-CAST (Owl Scientific, Inc., США). Краситель SYBR Green I добавляли в гель в соответствии с инструкцией производителя. Обычно на лунку загружали 0,3 мкг ДНК, если не указано иное. Образцы, обработанные мочевиной, готовили инкубацией в течение 1 ч 50 мкг / мл раствора ДНК с равным объёмом 2 М мочевины. Мочевину удаляли длительным диализом против воды. Изображение геля при УФ-освещении фиксировали с помощью цифровой камеры. Для расчёта профилей светимости электрофоретических дорожек использовали программное обеспечение собственной разработки. Каждое изображение полосы разделяли на прямоугольники, одна сторона которого была равна ширине полосы, а другая - четырём пикселям. Яркость пикселей усредняли внутри каждого прямоугольника. Усреднённую яркость для каждой позиции затем использовали для построения профиля яркости.

Для конденсации молекул ДНК 5 мкг/мл раствора смешивали с равным объёмом 40 мкМ раствора хлорида гексаминкобальта (III) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для АСМ поверхность отщеплённого образца слюды обрабатывали парами АПТЭС при 120 °С в течение 1 ч, наносили раствор конденсированной ДНК и оставляли на 30 мин. Затем слюду промывали водой и сушили струёй воздуха. АСМ изображения обрабатывали вручную, измеряя высоту и диаметр глобул ДНК.

3.2.2. Электрофорез продуктов электрораспыления ДНК фага λ

Типичный образец полученных в процессе ЭР продуктов ДНК фага λ представлен на рис. 19А.

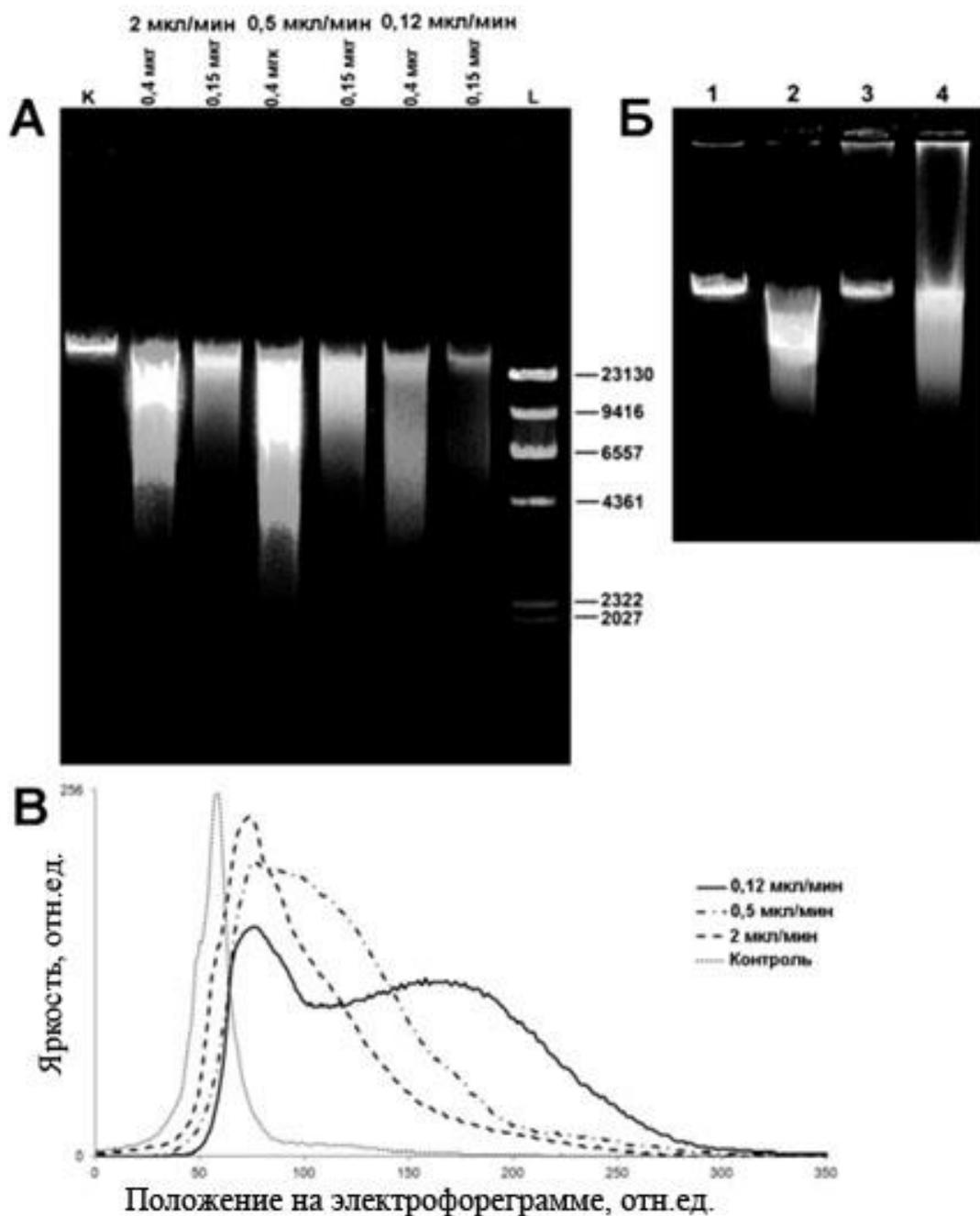


Рис. 19. Повреждение ДНК фага λ в зависимости от скорости потока раствора в капилляре. (А) Электрофорез образцов электрораспылённой ДНК при разных скоростях потока, указанных в верхней части рисунка. Две дорожки загружены указанными количествами ДНК для каждой скорости. К - нативная ДНК, L – стандартные маркеры молекулярных масс (п.о.). (Б) Влияние инкубации электрораспылённой ДНК в 2 М мочеvine на положение искажённой полосы. Дорожки: 1 - нативная λ -ДНК, 2 - электрораспылённая λ -ДНК, 3 - нативная ДНК, инкубированная в 2 М мочеvine, 4 - электрораспылённая ДНК, инкубированная в 2 М мочеvine. (В) Фотометрические профили полос, нагруженных 0,15 мкг ДНК, распылённой при различных скоростях потока, показаны на панели А.

Анализ продуктов электрофоретического разделения показывает, что молекулы ДНК фага λ значительно повреждаются при всех условиях ЭР. Электрофореграмма характеризуется наличием непрерывного шлейфа фрагментов ДНК с более низкой молекулярной массой, чем у исходной нативной ДНК. Очевидно, что появление шлейфа связано со случайными разрывами молекул ДНК в неспецифических местах, что приводит к смеси фрагментов различной длины. Другим заметным эффектом является смещение положения полосы с наименьшей подвижностью относительно положения нативной, неповрежденной ДНК. Этот сдвиг не является артефактом процедуры электрофореза: когда в электрораспыленный образец добавили нативную ДНК λ -фага, появилась новая полоса с подвижностью, соответствующей подвижности исходной ДНК. Кроме того, подвижность структурно-искаженной ДНК (обозначим её sd-ДНК) возвращалась к подвижности нативной ДНК, после того как электрораспыленная ДНК была инкубирована в 2 М мочеvine в течение 1 ч (рис. 20Б). Такая же обработка мочевиной нативной ДНК фага λ не изменяла ее электрофоретической подвижности. Можно предположить, что, в дополнение к фрагментации, ЭР вызывает некоторые обратимые изменения в нековалентных взаимодействиях, приводящих к образованию структуры ДНК, которая электрофоретически является более подвижной, чем нативная ds-ДНК.

3.2.3. Зависимость повреждения молекул ДНК от различных факторов

Как следует из рис. 19А,Б, степень фрагментации ДНК зависит от скорости потока раствора ДНК во время распыления: чем выше скорость, тем ниже интенсивность. Профили светимости, рассчитанные по соответствующим дорожкам электрофореза, представлены на рис. 19В. По представленным данным можно количественно определить две основные составляющие продуктов электрораспыления λ -ДНК: область sd-ДНК и непрерывный набор более мелких фрагментов. Для проведения количественных оценок вклад яркости полосы sd-ДНК вычитали из доли меньших фрагментов, а распределение фрагментов ДНК по размерам рассчитывали следующим образом. Чтобы выделить полосу sd-ДНК в профиле светимости, предполагалось, что она имеет гауссову форму. Как показано на рис. 20, при более высокой молярной массе (кривая слева) хвост профиля полной светимости хорошо аппроксимируется гауссианом. Параметры для гауссиана выбирали вручную, чтобы точно соответствовать левому хвосту. Для получения спектров подвижности продуктов фрагментации ДНК этот гауссиан вычитали из общего профиля. Подвижность преобразовывали в размер фрагмента ДНК с использованием зависимости электрофоретической подвижности ДНК от размера, представленной на рис. 21. Для построения кривой использовали электрофоретические данные для линейки стандартов ДНК в полосе L на рис. 19А. Для полосы sd-ДНК сдвиг подвижности рассчитывали относительно нативных молекул, имеющих средний размер ~ 50 тыс.п.о. Распределение светимости преобразовывали в распределение фрагментов ДНК, предполагая, что интенсивность флуоресценции, то есть

количество красителя, связанного с фрагментом ДНК, пропорциональна их длине и концентрации [173].



Рис. 20. Выделение полосы sd-DNA и сдвига её подвижности по отношению к нативной полосе из общего профиля светимости.

Пример спектра фрагментов, генерируемых в процессе ЭР при скорости потока 0,5 мкл / мин, представлен на рис. 20А пунктирной линией.

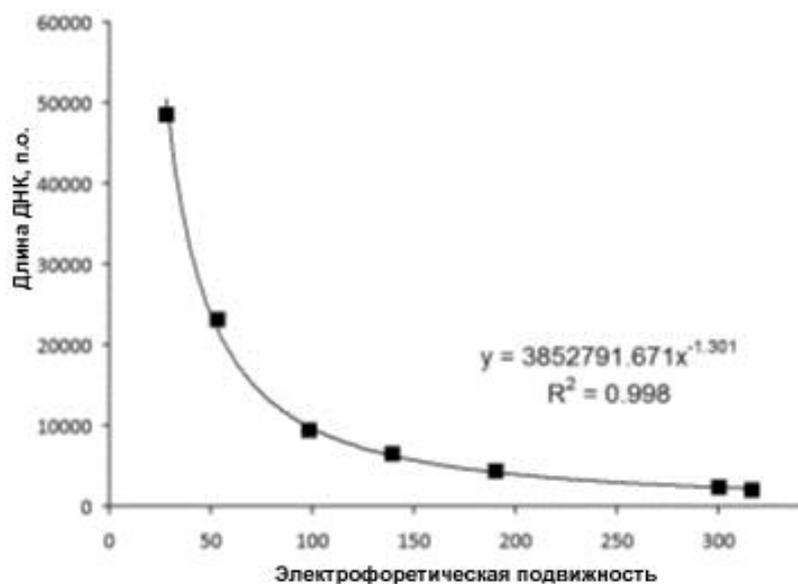


Рис. 21. Зависимость электрофоретической подвижности от размера фрагмента ДНК.

Средний размер фрагмента определяли путём усреднения спектров размеров, рассчитанных аналогичным образом. Сравнивая количество ДНК в шлейфе и в полосе sd-ДНК, рассчитывали также долю фрагментированной ДНК. Обоснованность расчёта подтверждали сравнением спектра фрагментов, рассчитанного по светимости, со спектром, полученным из данных АСМ.

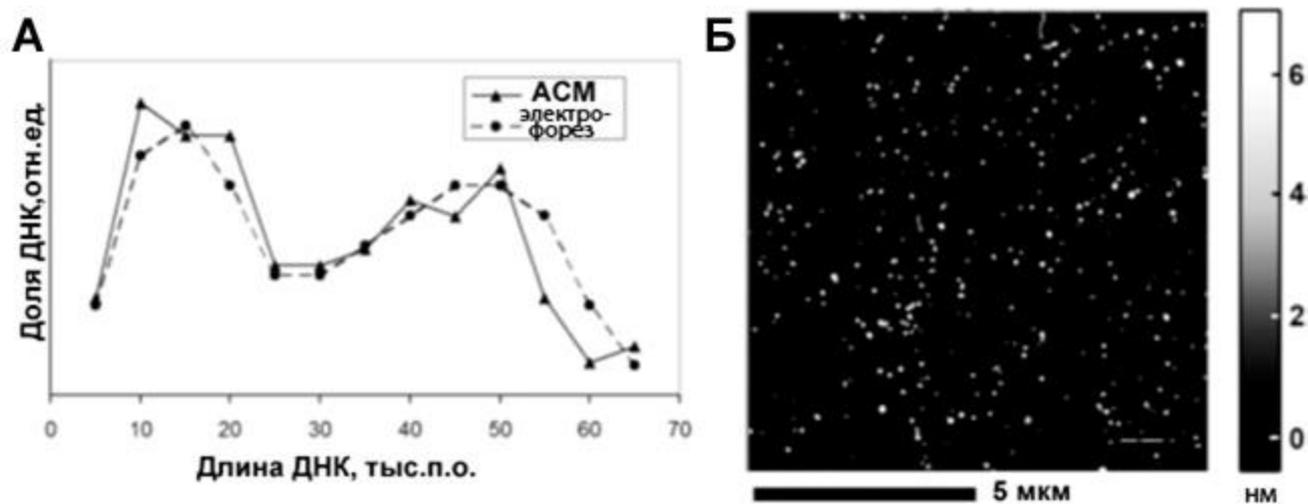


Рис. 22. Распределение фрагментов распылённой ДНК λ -фага. (А) Распределение, рассчитанное по данным АСМ (треугольники, сплошная линия) и электрофореза (кружки, пунктирная линия). (Б) АСМ-изображение распылённой конденсированной ДНК, адсорбированной на поверхности аминированной слюды. Скорость потока при ЭР - 0,5 мкл/мин.

Размер фрагментов ДНК определяли по объёмам глобул, полученных в результате конденсации с хлоридом гексамминкобальта (III). Продукты конденсации сорбировали на поверхности слюды, покрытой АПТЭС. На АСМ-изображениях выбирали ряд компактных глобул, и распределение размеров фрагментов рассчитывали по формуле:

$$(\text{длина фрагмента}) = (\lambda - \text{длина ДНК}) \times (hd^2) / (h_0d_0^2) \quad (2),$$

где h и d - высота и диаметр фрагмента ДНК, h_0 и d_0 - средняя высота и средний диаметр глобул λ -ДНК, не подвергнутых распылению. Как видно на рис. 20А, спектр светимости полностью совпадает со спектром, полученным из данных АСМ (пунктирная и сплошная линии соответственно). Это показывает, что расчёты спектров верны. Рассчитанные средние размеры фрагментов и фракций фрагментированной ДНК приведены в табл. 9.

Таблица 9. Зависимость доли повреждённых молекул ДНК фага λ от размера фрагмента.

Скорость потока, мкл / мин	Длина ДНК, тыс.п.о.	Доля повреждённых молекул ДНК ^а , %	Средний размер фрагмента ^а , тыс. п.о.
2,0	49	41	9 ± 6
0,5	49	52 (43)	10,5 ± 5 (10–15)
0,12	49	64	5,5 ± 2,7
0,5	23	42	8,6 ± 3,1
0,5	9.4	19	5,1 ± 2
0,5	6.6	6	-
0,5	4.4	0	-

^aЗначения в скобках рассчитывали на основе данных АСМ, остальные - на основе данных электрофореза в агарозном геле.

Из данных табл. 9 видно, что средняя длина фрагмента сильно зависит от скорости потока распыляемого раствора: при увеличении скорости в 4 раза фрагменты становятся в среднем в два раза длиннее. Напротив, доля фрагментированной ДНК слабо зависит от скорости потока, т.е. независимо от скорости, часть молекул ДНК избегает фрагментации. Обнаружено также, что степень фрагментации ДНК сильно зависит от её размера. Четыре фрагмента, полученные после ферментативной обработки ДНК фага λ эндонуклеазой HindIII, были выделены и подвергнуты электрораспылению. Как видно из результатов электрофоретического разделения продуктов, представленных на рис. 23, можно сделать вывод, что чем меньше фрагмент ДНК, тем меньше он повреждается в процессе электрораспыления. Самый маленький фрагмент ДНК размером 4,3 тыс. п.о. после распыления не имел признаков деструкции.

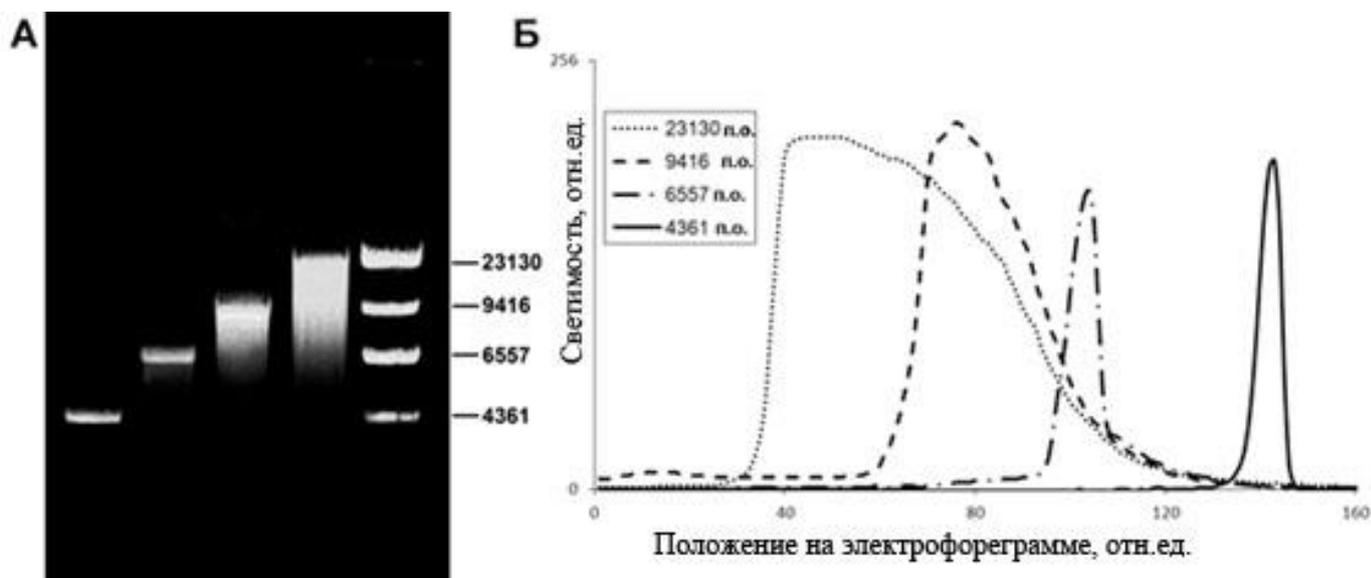


Рис. 23. Зависимость степени фрагментации ДНК фага λ от длины. (А) Электрофоретические характеристики четырех HindIII - фрагментов ДНК, полученных после распыления (размеры в п.о. указаны справа). (Б) Фотометрические профили четырёх дорожек, представленных на панели А.

Для выяснения механизма фрагментации было проверено действие физических и химических факторов, способных влиять на гидродинамические силы, такие как вязкость, поверхностное натяжение распыляемого раствора, режим электрораспыления. Полученные электрофоретические данные и подробные условия эксперимента представлены на рис. 24 и в табл. 10.

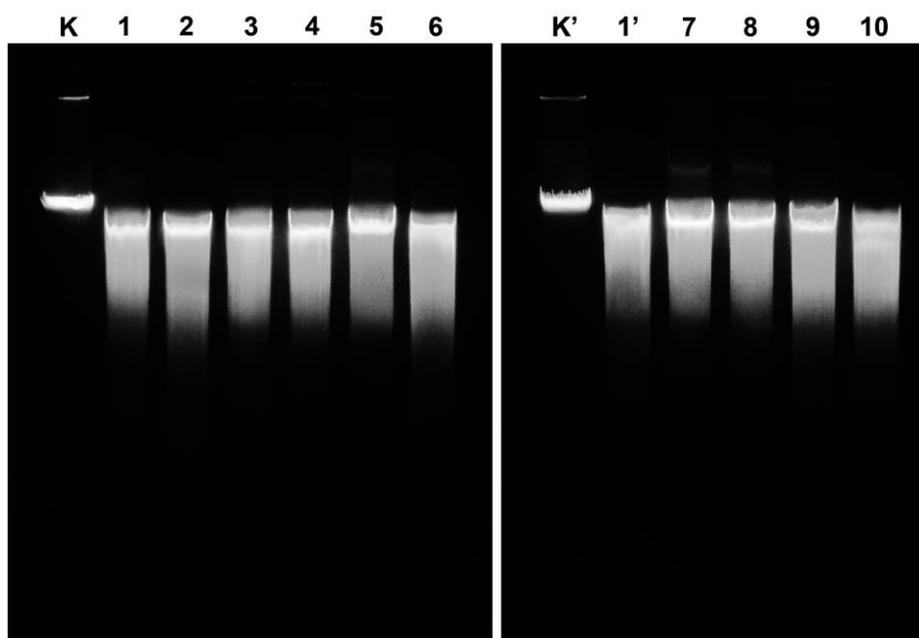


Рис. 24. Электрофорез образцов ДНК фага λ после электрораспыления в различных условиях, приведённых в табл. 11. К - нативная ДНК, К' - образец ДНК, взятый из капилляра после ЭР. Нагрузка составляла 0,25 мкг ДНК на дорожку.

Таблица 10. Описание условий ЭР, использованных для приготовления образцов (рис. 24).

Дорожки	Ток, нА	Конц. ДНК, мкг/мл	Потенциал ^а	Грифторэтанол	Глицерин, 50 об. %	20 мМ аскорбиновая к-та	20 мМ дитиотреитол	Расстояние от капилляра до поверхности, мм ^б
1, 1'	100	50	+	-	-	-	-	30
2	40	50	+	-	-	-	-	30
3	200	50	+	-	-	-	-	30
4	100	5	+	-	-	-	-	30
5	100	50	-	+	-	-	-	30
6	100	50	+	+	-	-	-	30
7	100	50	+	-	+	-	-	30
8	100	50	+	-	-	+	-	30
9	100	50	+	-	-	-	+	30
10	100	50	+	-	-	-	-	1

^аЗнак потенциала, приложенного к раствору ДНК в капилляре.

^бРасстояние от капилляра до поверхности капли воды, в которую собираются продукты распыления.

К нашему удивлению, в отличие от скорости потока и длины ДНК, ни один из других факторов не изменил электрофоретическую картину продуктов электрораспыления образца ДНК. Изменения в знаке потенциала и значениях напряжения и тока также не влияли на степень повреждения. На молекулы ДНК не действовали и электрохимические продукты, которые могли образоваться на платиновой проволоке: повреждений не наблюдалось в оставшемся в капилляре растворе после ЭР образца ДНК с концентрацией 50 мкг/мл в течение 10 мин. Добавление восстановителей или изменение концентрации ДНК при распылении также не изменяли состав получаемых продуктов.

Ещё одним фактором, от которого зависит стабильность структуры молекул ДНК, является ионная сила. Так как для увеличения скорости распыления использовали диализованную ДНК (проводимость соответствовала проводимости 50-100 мкМ КСl), было проведено сравнение продуктов распыления таких образцов и ДНК, растворённой в 1 мМ NaCl (при более высоких концентрациях соли ЭР провести не удалось) и 0,05 мМ NaCl. Картина повреждения молекул после ЭР оказалась такой же, как для раствора ДНК, имеющего проводимость в 20 раз ниже (рис. 25).

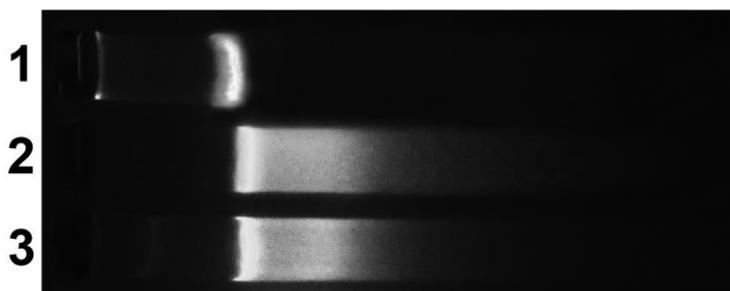


Рис. 25. Влияние ионной силы на степень повреждения ДНК фага λ при электрораспылении. 1 - нативная ДНК; 2 – продукты распылённой ДНК в 1 мМ растворе NaCl (проводимость 97 мкСм/см); 3 - продукты распылённой ДНК в 0,05 мМ растворе NaCl (проводимость 6 мкСм/см). Другие условия: положительный потенциал, ток - 100 нА, скорость электрораспыления - 0,12 мкл / мин, концентрация ДНК - 50 мкг / мл, нагрузка на дорожку - 0,25 мкг ДНК.

Таким образом, низкая ионная сила раствора также не оказывает существенного влияния на повреждение ДНК. Все эти данные, взятые вместе, указывают на то, что ДНК фрагментируется вязкими силами в конусе Тейлора или в непосредственной близости от него и что степень деструкции тем выше, чем длиннее молекула и чем больше время действия. Ожидалось, что увеличение вязкости может усилить фрагментацию. Для этого исследовали зависимость изменения диаметра струи распыляемого раствора от добавок глицерина. Для измерения диаметра струи фотографировали кончик капилляра во время ЭР, как показано на рис. 27, с помощью оптического микроскопа с темнопольным осветителем (объектив 40 х и камера 5 Мпикс).

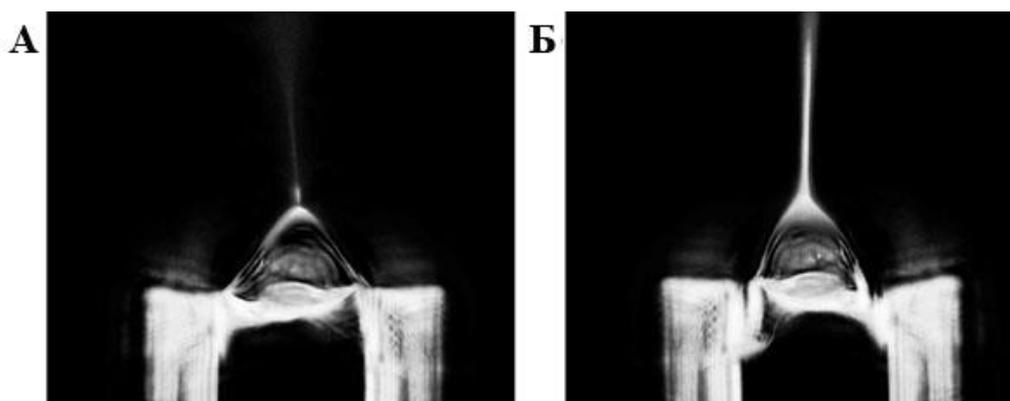


Рис. 26. Изображения конуса Тейлора и струи при электрораспылении воды (А) и 50 об. % глицерина (Б) при положительном потенциале и токе 100 нА. Внутренний диаметр капилляра - 50 мкм. Толстые струи выглядят ярче за счёт более интенсивного рассеяния света.

Полученные значения диаметра струи, измеренные в различных условиях, представлены в табл. 11.

Таблица 11. Диаметр струи при различных условиях электрораспыления.

Скорость потока, мкл/мин	Ток ^а , нА	Пары трифторэтанола	Глицерин, 50 об. %	Диаметр струи ^б , мкм
0,5	100	-	-	1
2	100	-	-	2
0,5	200	-	-	1
0,5	100	-	+	2 - 3
0,5	100	+	-	1

^аРаспыление при положительном потенциале жидкости в капилляре.

^бОшибки составляют в каждом случае около 20%.

Данные табл. 11 показывают, что ни ток, ни вязкость, ни поверхностное натяжение распыляемого раствора не влияют на геометрию струи. Четырёхкратное увеличение скорости потока приводит к пропорциональному увеличению площади поперечного сечения струи, тем самым сохраняя линейную скорость потока в струе постоянной. Добавление 50 об. % глицерина увеличивает динамическую вязкость раствора с $\eta_0 = 1$ мПа с (вода) до $\eta_g = 6$ мПа с [174] и приводит к увеличению диаметра струи примерно в $(\eta_g/\eta_0)^{1/2} = 2,4$ раз. Экспериментальные данные говорят о том, что увеличение вязкости компенсируется уменьшением скорости потока внутри струи, так что сопротивление, пропорциональное произведению линейной скорости потока на вязкость, практически не изменяется при добавлении глицерина. В результате, общий эффект вязкости на

повреждение ДНК близок к нулю. Для оценки сил вязкого сопротивления, действующих на молекулу ДНК фага λ в процессе ЭР, считалось, что вытянутая молекула ДНК длиной $l = 20$ мкм находится в линейном градиенте скорости потока, так что скорости на противоположных концах молекулы различаются на $\Delta v = 10$ м/с. Рассматривая молекулу ДНК как цепочку сферических сегментов с $N = l/d$ (где $d = 2$ нм - диаметр двойной спирали ДНК) и предполагая, что вязкая сила действует на каждый сегмент независимо, с помощью закона Стокса можно оценить максимальное значение силы, действующей в середине цепи, как

$$F = \Sigma 3\pi\eta d \cdot v_i \quad (3),$$

где $\eta = 1$ мПа·с - вязкость воды, v_i - скорость потока на i -м отрезке, $v_i = \Delta v \cdot i/N$, $i = 1 \dots N/2$.

Интегрирование сил, действующих на все отрезки, даёт оценку силы:

$$F = 3/8\pi\eta d N \cdot \Delta v = 3/8\pi\eta l \cdot \Delta v = 250 \text{ нН}.$$

Полагая, что за повреждение ДНК при ЭР ответственны в основном механические силы, можно заключить, что конденсация линейных молекул ДНК в маленькие глобулы должна защитить их от повреждения. Для конденсации ДНК использовали хлорид гексамминкобальта (III), поскольку другие конденсирующие агенты, а именно спермин, спермидин и полиэтиленимин, вызывали агрегацию ДНК. Тем не менее, чтобы в процессе ЭР капилляр не забивался, и в этом случае специально подбирали концентрации ДНК и хлорида гексамминкобальта (III). Анализ электрофоретических данных продуктов распыления конденсированной ДНК фага λ не выявил каких-либо заметных повреждений (рис. 27А). На изображениях, полученных методом АСМ образцов распылённой конденсированной ДНК, видны множественные глобулы с постоянным размером и высотой (рис. 27Б), некоторые имели тороидальную форму (рис. 27В).

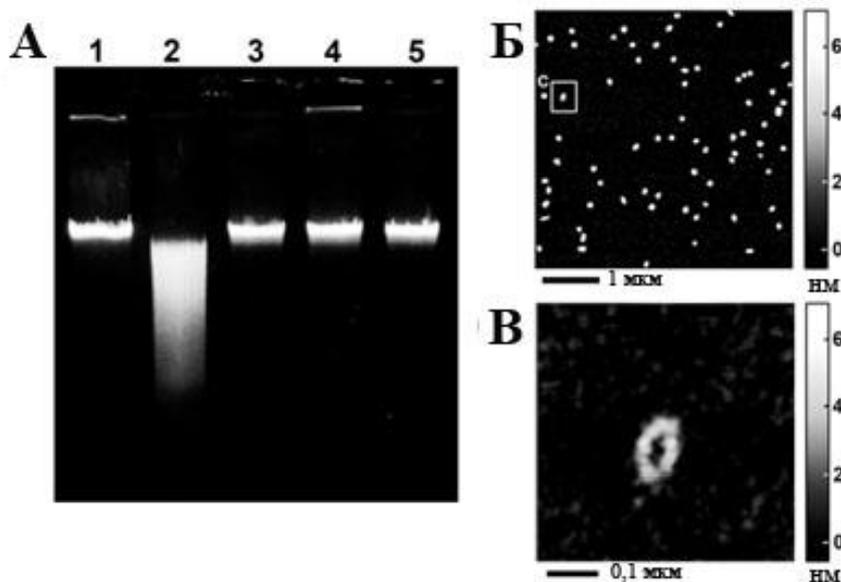


Рис. 27. Конденсация защищает ДНК фага λ при электрораспылении. (А) Электрофореграмма образцов ДНК после ЭР. 1 - нативная ДНК, 2 – нативная ДНК после ЭР, 3 - конденсированная ДНК, 4 и 5 - конденсированная ДНК после ЭР (два независимых эксперимента). (Б) АСМ-изображение конденсированной ДНК после ЭР. (В) Увеличенное изображение тороидальной конденсированной молекулы ДНК, не повреждённой при ЭР.

При конденсации радиус вращения спирали ДНК фага λ падает с 600 до 40 нм [175], что приводит к соответствующему уменьшению силы сдвига, действующей на молекулы ДНК. Поскольку конденсация ДНК полностью защищает её как от фрагментации, так и от искажения вторичной структуры в процессе ЭР, можно заключить, что повреждение линейной молекулы ДНК вызваны механическими силами.

3.2.4. Механизм повреждения молекул ДНК при электродинамическом распылении

Согласно полученным данным, фрагментация ДНК всегда сопровождалась смещением положения полосы sd-ДНК относительно полосы нативной ДНК. Как видно на рис. 24А, сдвиги искажённых полос фрагментов после ферментативного расщепления ДНК HindIII были меньше для более коротких фрагментов, так же, как и степень их фрагментации. Эта корреляция показывает, что силы, ответственные за фрагментацию и за искажение, одинаковы. Обработка «искажённых» молекул ДНК мягким хаотропным агентом (2 М мочевиной) восстановила их электрофоретическую подвижность, указывая на то, что наблюдаемый сдвиг обусловлен перестройками в сети водородных связей. Хорошо известно, что механическое напряжение может вызывать конформационные изменения и частичное расплавление dsДНК [176]. Поскольку цепь ДНК может быть ослаблена закручиванием во время распыления, в различных положениях, особенно с высоким содержанием А-Т пар, могут образоваться одноцепочечные участки различной длины. Такая перегруппировка требует силы, равной 60 pN [177], что в 2 раза меньше, чем для разрыва ковалентной связи. Можно предположить, что молекулы ДНК, избежавшие фрагментации, тем не менее подверглись частичному возмущению своей вторичной структуры, которая быстро замораживалась в сохнувших микрокаплях. Вопрос, который остаётся открытым: где именно молекулы ДНК подвергаются повреждающим воздействиям при ЭР. Возможные участки схематически показаны на рис. 28.



Рис. 28. Схема возможных сайтов повреждения ДНК при электрораспылении.

Молекула ДНК может повреждаться при электрохимическом воздействии или при окислении вблизи электрода в капилляре (положение 1), в вихре внутри конуса Тейлора (2), в верхней части конуса Тейлора, где жидкость образует струю (3), и где струя распадается на первичные материнские капли (4). Наконец, ДНК может повреждаться при высыхании материнских капель при их последующем распаде, когда они достигают предела стабильности Рэлея (5). Электрохимические и окислительные повреждения в капилляре (1) были исключены в контрольных экспериментах, которые показали, что не наблюдалось никаких изменений в ДНК, взятой из капилляра после эксперимента, и что ни аскорбиновая кислота, ни дитиотреитол не имели никакого защитного эффекта. Положения 4 и 5 были отклонены, поскольку повреждение ДНК не зависело от расстояния между кончиком капилляра и каплями: повреждение ДНК наблюдалось даже при проведении распыления на расстоянии 1 мм от поверхности капли, что исключало высыхание распылённых капель [113]. Учитывая приведенные доводы, можно заключить, что сам конус Тейлора, переход к струе (положения 2 и 3 на рис. 29) и место её распада на капли (4) являются наиболее вероятными сайтами повреждения линейной ДНК. Грубые оценки сил и продолжительности воздействия в этих положениях позволяют определить наиболее опасное место. Сдвиговое течение в конусе Тейлора (положение 2) можно оценить на основе численного моделирования скоростей потока в конусе [129, 159]. Распределение векторов течения показывает, что наибольшее напряжение сдвига достигается вблизи вершины конуса Тейлора, где поток изменяет свой вектор от 0 до $v = 10$ м/с и генерируется напряжение сдвига $G = v/d \sim 10^7$ с⁻¹. Однако фрагментация λ -ДНК, хоть и очень медленная, наблюдалась и при гораздо меньших

значениях скорости сдвига: половина молекул повреждалась при $G \sim 10^5 \text{ с}^{-1}$ за $\tau = 100 \text{ с}$ [178]. Кинетика процесса описывается реакцией первого порядка с константой скорости, пропорциональной напряжению сдвига [171], поэтому степень сдвига ДНК должна быть пропорциональна $G\tau$. Из приведённых литературных данных, для разрушения половины молекул λ -ДНК требуется $G\tau \sim 10^7$. Можно оценить среднее время жизни ДНК, τ_1 , в вихревом конусе Тейлора. Учитывая, что объём наиболее значимой части конуса Тейлора меньше $V = 10^3 \text{ мкм}^3$ (то есть в 10 раз больше диаметра испускаемой струи), при самой медленной скорости потока $Q = 0,12 \text{ мкл} / \text{мин}$ ДНК подвергается вихревому сдвигу в течение $\tau_1 \sim V/Q = 10^{-3} \text{ с}$, что соответствует $G\tau_1 = 10^4$. Этого явно недостаточно, чтобы разорвать в этой части заметную часть молекул ДНК. В положении 3 жидкость в верхней части конуса Тейлора ускоряется с 1 см/с (внутри капилляра) до 10 м/с (на поверхности конуса Тейлора) [159]. Последняя оценка максимальной скорости подтверждается измерениями диаметра струи: $d = 1 \text{ мкм}$ при скорости потока $Q = 0,5 \text{ мкл} / \text{мин}$. Соответствующая линейная скорость в струе равна $v = 4Q / \pi d^2 = 10 \text{ м} / \text{с}$, как и предсказывает численное моделирование. Увеличение скорости до 10 м/с достигается на расстоянии, сравнимом как с размером конуса Тейлора, так и с длиной вытянутой молекулы ДНК [179]. Ускорение жидкости от 0 до 10 м/с на расстоянии, сравнимом с длиной вытянутой молекулы $l = 20 \text{ мкм}$, создаст силу вязкого сопротивления $\sim 250 \text{ нН}$, как рассчитано выше. Время, которое эта сила действует на ДНК фага λ , составляет $\tau_2 \sim l / v \sim 1 \text{ мкс}$, что соответствует чрезвычайно высокой скорости нагружения $T = F/\tau_2 = 0,1 \text{ Н} / \text{с}$. Хотя такая скорость выходит за пределы современных теорий разрыва связи [180], силы 250 нН недостаточно, чтобы разорвать типичную ковалентную связь. Это указывает на то, что именно вязкое сопротивление на кончике конуса Тейлора может разрушить длинную молекулу ДНК. Этот механизм повреждения хорошо соответствует всем экспериментальным данным. Наблюдаемое усиление повреждения ДНК с уменьшением скорости потока при ЭР является следствием того, что молекулы ДНК проводят в конусе Тейлора длительное время. Кроме того, вязкие силы, очевидно, действуют сильнее на более длинные полимерные цепи, чем на короткие. Когда микрокапля отделяется от струи (положение 4), молекула ДНК с диаметром $d = 2 \text{ нм}$, которая образует мостик, в этом случае подвергается воздействию силы, равной $F = \pi d\sigma \sim 400 \text{ пН}$ [181]. При максимальной скорости капли $v \sim 100 \text{ м/с}$ и характерном расстоянии, близком к длине молекулы ДНК $l = 10 \text{ мкм}$, эта сила действует на цепь ДНК в течение $\tau_3 = l/vd = 10^{-7} \text{ с}$. При такой скорости нагружения, $T = F/\tau_3 = 4 \times 10^{-3} \text{ Н/с}$, типичная ковалентная связь разрывается, когда сила значительно превышает 500 пН [180]. Эта оценка показывает, что молекула ДНК не может быть повреждена, когда она попадает между двумя каплями распыляемой жидкости. Некоторые из представленных данных, на первый взгляд, противоречат этому качественному описанию. Действующая сила должна сильно зависеть от поверхностного натяжения раствора при ЭР, однако этого не наблюдалось в экспериментах с

трифторэтанолом. Увеличение поверхностного натяжения раствора, приводящее к более толстой струе и к более крупным материнским каплям, должно было оказать защитное воздействие на ДНК, но этого также не наблюдалось. С исключением положения 4, именно положение 3, в котором ДНК подвергается воздействию вязкой силы в ускоряющейся струе жидкости, остаётся наиболее вероятным местом повреждения ДНК, что согласуется со всеми оценками и экспериментальными данными.

3.2.5. Выводы к разделу 3.2.

Показано, что линейные фрагменты ДНК длиной более 5 тыс. п.о. при ЭР подвергаются интенсивному механическому повреждению. Повреждение состоит как из случайного разрыва молекул ДНК, в результате чего образуются фрагменты разной длины, так и из обратимых структурных изменений, которые проявляются в увеличении электрофоретической подвижности продуктов. Степень фрагментации увеличивается с увеличением длины ДНК и уменьшением скорости потока раствора при распылении. Вершина конуса Тейлора, где образуется заряженная струя, является наиболее вероятным местом повреждения длинных линейных молекул. Конденсация ДНК в компактные глобулы полностью защищает её от повреждения при ЭР. Ожидается, что представленные результаты будут полезны при разработке новых способов генной терапии с избирательной доставкой препаратов в форме аэрозолей, а также в других приложениях. Полученные данные также могут быть полезны для понимания физических процессов ЭР, а именно, природы и масштаба механических сил, действующих на макромолекулы и другие молекулярные структуры. Например, показана гибель випусов при ЭР [182], и этот факт был также объяснён действием гидродинамических сил. Поскольку процесс ЭР позволяет генерировать скорости нагружения выше 10^9 пН/с, которые нельзя получить другими экспериментальными методами, этот способ может стать уникальным инструментом для изучения молекулярной механики при чрезвычайно высоких силах и быстрых нагрузках.

3.3. Быстрый ультрачувствительный гибридационный анализ на микрочипах с применением магнитных меток

Разработка быстрых, высокочувствительных и рентабельных способов детекции нуклеиновых кислот остаётся актуальной задачей для широкого круга приложений. В частности, экспресс-анализ ДНК играет значительную роль в медицинской диагностике, криминалистике, при угрозе биотерроризма и в сфере биобезопасности [183-188]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время является общепризнанным золотым стандартом [189-192], она чрезвычайно чувствительна и способна обнаружить единичные молекулы ДНК [190]. Однако время анализа не может быть существенно уменьшено с минимального предела в 30 мин для 40 циклов реакции [191]. Другие ограничения методов, основанных на ПЦР, включают: (i)

возможность появления ложноотрицательных результатов из-за присутствия ингибиторов в пробах, (ii) зависимость эффективности амплификации от нуклеотидной последовательности ДНК, (iii) возможные ошибки амплификации и образование химерных и гетеродуплексных молекул [192], (iv) ограниченная мультиплексность [190]. В случае анализа кДНК дополнительные ошибки могут быть внесены на стадии обратной транскрипции. Методы, не использующие амплификацию мишени, как правило, более быстрые и менее чувствительны к посторонним примесям в пробах, но часто требуют сложного и дорогостоящего оборудования. В табл. 12 приведены характеристики некоторых таких методов. Большая часть из них также использует своего рода усиление, но вместо мишени амплифицируются сигнал или зонд. Методы амплификации зонда включают дополнительные реакции с участием лигазы или полимеразы, они обеспечивают высокую специфичность и используются для выявления точечных мутаций, но сложная и длительная процедура анализа ограничивает их использование [191, 192]. Еще одним способом повышения чувствительности является усиление сигнала. Этот подход является общим для различных электрохимических сенсорных систем, где одна метка вызывает несколько событий, которые, в свою очередь, генерируют сигнал. Электрохимическое обнаружение может быть достигнуто без каких-либо меток, при этом сама dsДНК выступает в качестве метки [193, 194]. Часто для усиления сигнала используются частицы золота [192, 195-197].

Таблица 12. Обзор методов гибридизационного анализа без использования ПЦР.

Используемый метод	ПрО (концентрация или количество)	Время анализа	Ссылки
Электрохимическая детекция ^а	1 фг/мкл	30 мин	193
Хемилюминесценция ^а	0.3 фМ	> 100 мин	195
Электрохимическая детекция ^а	0.6 фМ	> 90 мин	196
Анализ одиночных квантовых точек	zeptomol	1 ч	197
Метод плазмонного резонанса ^а	10 фМ	100 с	198
Каталитическое осаждение золота ^а	0.3 фМ	> 40 мин	199
Кулонометрическое измерение переноса электронов с помощью наночастиц золота ^а	1 fM	> 3 ч	200
Флуоресцентная детекция ^б	0.1 фМ	> 10 мин	201
Капиллярный электрофорез, визуализация одной молекулы ^б	0.3 фМ	10 мин, электрофорез	202
Флуоресцентная детекция ^б	39 фМ	1 ч	203

Флуоресцентная детекция (TIRFM) с квантовыми точками ^б	10 фМ	> 2 ч	204
Электромеханическая передача сигнала ^б	10 фМ	> 12 ч	205
Эпифлуоресцентная микроскопия, обнаружение одной молекулы ^б	1.3 фМ	> 1 ч	206
Анализ по дискриминации силы в потоке ^б	9 фМ	25 мин	208

а - усиление сигнала или зонда, б - методы без усиления

Усиление сигнала обычно влечёт за собой либо увеличение продолжительности анализа, либо необходимость в сложных аналитических процедурах, которые повышают стоимость анализа. Исключительно высокая чувствительность в анализах без амплификации была достигнута, в основном, при использовании сложных и дорогих оптических устройств [207]. Отдельно следует отметить работу [208], в которой удалось определить ДНК в фемтомолярной концентрации без амплификации, применяя на стадии детекции сигнала магнитные частицы и гидродинамические силы потока. На раннем этапе работы использование магнитных меток и магнитного поля в стационарном режиме позволило нам обнаружить 3 амоль биотинилированного олигонуклеотида в 3 мкл образца [209].

Целью исследований, представленных в данном разделе, была разработка метода гибридизационного анализа ДНК, основанного на «активной» технологии и отличающегося высокой скоростью, простотой и в то же время высокой чувствительностью и специфичностью при работе с реальными биологическими образцами сложного состава. До сих пор такая платформа применялась исключительно для обнаружения белковых молекул и вирусов. Также была изучена возможность обнаружения неспаренности (мисматчей) отдельных оснований с помощью силовой дискриминации ДНК-дуплексов в процессе гибридизации.

3.3.1. Материалы и методы исследования

В табл. 13 приведены последовательности использованных в работе олигонуклеотидов (Синтол, Россия), составленных на основании анализа нуклеотидных последовательностей соответствующих ДНК.

Таблица 13. Последовательности использованных олигонуклеотидов.

Детектируемый фрагмент ДНК	Функция олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида (5'-3')
----------------------------	-------------------------	--

Ампликон митохондриальной ДНК человека	ПЦР, прямой	CCCTAAAACCCGCCACATCT
	ПЦР, обратный 1 ^a	AGAGCGATGGTGAGAGCTAAGG
	ПЦР, обратный 2 ^b	GGGTGAGTGGTAGGAAGTTTTTTCATAG
	Зонд	NH ₂ -ATCACCCCTCTACATCACCGCCCCG
	Адаптер	CCTTAGCTCTCACCATCGCTCT-biotin
	Блокирующий 1	GGGATTTTGGGCGGTGTAGATGGTA
	Блокирующий 2	AGGTCGG
	Блокирующий 3	GGAGGGGGGTTCATAGTAGAAGAG
Модельные последовательности для изучения механической силы ДНК-дуплексов	Гибридизационный олигонуклеотид "тест"	CCTTAGCTCTCACCATCGCTCT-biotin
	12-членный	TGAGAGCTAAGG-NH ₂
	11- членный	GAGAGCTAAGG-NH ₂
	12- членный, ошибка на конце	GGAGAGCTAAGG-NH ₂
	12- членный, ошибка посередине	TGAGAGATAAGG-NH ₂
<i>Escherichia coli</i> , геномная ДНК, ген <i>stx1</i>	Зонд	NH ₂ - TGAATGTCATTCGCTCTGCAATAGGTACT C
	Адаптер	CATTACAGACTATTTTCATCAGGAG-biotin
	Блокирующий 1	TCAGCGAATCTACATACGTCTTTGCAG
	Блокирующий 2	AATGGAG
	Блокирующий 3	TATCAATCATCAGTAAAGACGTACCTC
<i>Bacillus cereus</i> , геномная ДНК, ген <i>motB</i>	Зонд	NH ₂ - GCATCTACTTGCCCCGTATCACTAAACTT
	Адаптер	TTCAAGCATCTTTGACAATTTTACTGCAT- biotin
	Блокирующий 1	TGCAAAAGTAATGGAAAATACAATACCG G
	Блокирующий 2	TGAAAAGT
	Блокирующий 3	ATTACTAGTTGCTACATCAAAGCAAGATG
<i>Mycobacterium neoaurum</i> , геномная ДНК, ген <i>choD</i>	Зонд	NH ₂ - CGAGCCGGCGCGCAGGTGCACCCCCTC
	Адаптер	ACCTCGGTCCGGGAGTTCTCCCA-biotin

	Блокирующий 1	TCGCTCGGCCAGTCCGAGATAGTTCTT
	Блокирующий 2	GGTGAGG
	Блокирующий 3	CCTCCCAGACGCCGTCGGGCCGCTGG
	Зонд положительного контроля	NH ₂ -ATCACCCCTCTACATCACCGCCCCG
	Зонд отрицательного контроля	NH ₂ -GACCTATTATCGAAATAAC

^aИспользовался для получения короткого одноцепочечного фрагмента ДНК.

^bИспользовался для получения длинного двухцепочечного фрагмента ДНК.

Для проведения модельных экспериментов (проверка эффективности процесса иммобилизации и др.) использовали пару олигонуклеотидов:

для иммобилизации:

5'-amino-ATCACCCCTCTACATCACCGCCCCG-3'

и комплементарный ему:

5'-amino-CGGGGCGGTGATGTAGAGGGTGAT-biotin-3', для гибридизации.

В работе были опробованы следующие методы ковалентной иммобилизации аминокислотомодифицированных олигонуклеотидов на мембране из регенерированной целлюлозы:

- 1) активация поверхности мембраны с помощью EDC / NHS после её плазмохимической обработки для формирования карбоксильных групп;
- 2) окисление первичных спиртовых групп на мембране до альдегидов действием раствора дихромата калия;
- 3) активация первичных спиртовых групп на мембране действием цианурхлорида;
- 4) адсорбция на поверхности "склеивающего" слоя из полиэтиленимина и формирование на нём сшитой полимерной плёнки.

Были исследованы плёнки из: а) поливинилового спирта, сшитого глутаровым альдегидом, б) смеси окисленного периодатом декстрана и дигидразида адипиновой кислоты, в) термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы. В этом случае перед экспериментом поверхность плёнки активировали с помощью EDC / NHS.

Для проверки эффективности способа активации, на поверхность мембраны наносили капли по 0,5 мкл 10 мкМ раствора олигонуклеотида для иммобилизации и выдерживали 15 мин во влажной атмосфере. Дезактивацию поверхности проводили 0,5 М раствором этаноламина, pH 9. Затем рабочие зоны микрочипа инкубировали 15 мин в 0,1 мкМ растворе гибридизационного олигонуклеотида в PBS и после отмывки биотиновую метку детектировали с помощью МЧ, покрытых SA, методом "push-pull", как описано ранее. Для разных методов иммобилизации

определяли значения сигнала (плотность частиц в активной зоне микрочипа) и фона (плотность частиц вне активной зоны).

Для изготовления ДНК-микрочипов на мембране из регенерированной целлюлозы поверхность активировали действием 1%-ного раствора цианурхлорида в сухом пиридине в течение 1 мин, после чего мембрану промывали этанолом. Для прецизионного нанесения олигонуклеотидов использовали технологию ЭР, детально отработанную нами ранее при изготовлении белковых микрочипов, которая обеспечивает параллельное изготовление большого числа стандартизованных микрочипов с малым (~0,1 мм) размером активных зон. Готовые микрочипы хранили в холодильнике при +4 °С.

Для отработки условий проведения и определения чувствительности гибридизационного анализа необходимы образцы, содержащие точно известную концентрацию фрагментов ДНК. Путём амплификации человеческой митохондриальной ДНК были синтезированы четыре фрагмента: два одноцепочечных, содержащих 70 и 893 оснований и два, соответствующих двухцепочечных, длиной 70 и 893 пар оснований (п.о). Для получения коротких фрагментов использовали пару праймеров

5`-CCCTAAAACCCGCCACATCT-3` и 5`-AGAGCGATGGTGAGAGCTAAGG-3`,

для длинных - пару

5'-ACGAGGGTTCAGCTGTCTCTTACTT-3' и 5`-AGAGCGATGGTGAGAGCTAAGG-3`.

Двухцепочечные фрагменты получали методом симметричной ПЦР, а одноцепочечные - асимметричной ПЦР с избытком второго праймера 30:1. Фрагменты ДНК очищали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Для анализа рабочие зоны микрочипа инкубировали 15 мин в 0,1 мкМ растворе гибридизационного олигонуклеотида в PBS. После отмычки биотиновую метку детектировали с помощью магнитных частиц, покрытых SA, в проточной кювете при действии магнитного поля.

Определение проницаемости мембраны из регенерированной целлюлозы для фрагментов ДНК выполняли на установке для проведения ультрачувствительного анализа. Олигонуклеотид, меченный карбоксифлуоресцеином, длиной 30 оснований электрофоретически концентрировали из потока на поверхности мембраны (объём образца - 100 мкл, концентрация олигонуклеотида - 10 мкМ, скорость потока - 25 мкл/мин, концентрирующее напряжение – 100 В). Затем буферный раствор (20 мМ имидазол-глициновый буфер, рН 8), омывающий обратную сторону мембраны, в который мог попасть олигонуклеотид в случае его проникновения через мембрану, упаривали до объёма 2 мкл. Для удаления сорбированного в мембране олигонуклеотида к ячейке прикладывали напряжение обратной полярности и прокачивали 100 мкл того же буферного раствора при скорости потока 25 мкл / мин. Полученный раствор концентрировали до 2 мкл и измеряли флуоресценцию на спектрофлуориметре NanoDrop 3300 (ThermoScientific).

Для исследования механической прочности ДНК-дуплексов в зависимости от температуры, ионной силы и концентрации формамида использовали модельную систему, основанную на однокомпонентном ДНК-микрочипе с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом 5'-AGAGCGATGGTGAGAGCTAAGG-NH₂-3', полностью комплементарным тестовому олигонуклеотиду 5'-ССТТАGСТСТСАССАТСGСТСТ-biotin-3'. Микрочип инкубировали с избытком 10 мкМ тестового олигонуклеотида в PBS в течение 30 мин, закрепляли в проточной ячейке, выдерживали в течение 10 мин с 0,1 мас. % суспензией МЧ, покрытых SA, в PBS с 0,1 мас. % Твин-20. Затем в ячейке в течение 10 с создавали поток определённой скорости с помощью шприцевого насоса. При этом раствор имел заданные значения температуры (контролируемое с помощью установленной в проточной ячейке термопары), ионной силы и содержания формамида. Микрочип фотографировали и регистрировали оставшиеся на поверхности частицы. Цикл операций повторяли несколько раз с последовательно возрастающей скоростью потока. Аналогичным образом изучали возможность повышения специфичности анализа за счёт силовой дискриминации ДНК-дуплексов.

Для изучения влияния некомплемментарных замен в последовательности фрагмента на механическую прочность ДНК-дуплексов использовали модельную систему на основе четырехкомпонентного ДНК-микрочипа с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами («11-членный» и «12-членный»), полностью комплементарными «тестируемому» олигонуклеотиду (см. табл. 14), а также зондами, содержащими соответственно один некомплемментарный нуклеотид на конце или в середине последовательности. Микрочип инкубировали с 10 мкМ раствором тестируемого олигонуклеотида в PBS в течение 30 мин и фиксировали в проточной ячейке. Ячейку заполняли 0,1%-ной суспензией МЧ, покрытых SA, в PBS, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% ПВП, и частицам давали осесть в течение 10 мин. Затем через проточную ячейку прокачивали буфер для создания заданного значения напряжения сдвига. Микрочип фотографировали и регистрировали частицы, оставшиеся на поверхности. Цикл операций повторяли несколько раз с последовательно увеличивающейся скоростью потока.

В экспериментальной системе, моделирующей присутствие в образце нескольких бактериальных патогенов, использовали следующие микроорганизмы, любезно предоставленные с.н.с. ИБФМ РАН, к.б.н. Т.В.Ивашиной, и их ДНК маркеры:

Escherichia coli - ген *stx1*, последовательность зонда:

5'-NH₂-TGAATGTCATTCGCTCTGCAATAGGТАСТС-3',

последовательность адаптера:

5'-САТТАСАGАСТАТТТСАТСАGAG-biotin-3';

Nocardioideissimplex - ген *fabG3*, последовательность зонда:

5'-NH₂-GCCGAGGAAGACGCCGACCTGGTTGAC-3',

последовательность адаптера: 5'-GTCGATCACCCGCCGGTAGTCG-biotin-3';

Mycobacterium neoaurum - ген *choD*, последовательность зонда:

5'-NH₂-CGAGCCGGCGCGCAGGTGCACCCCTC-3',

последовательность адаптера: 5'-ACCTCGGTCCGGGAGTTCTCCCA-biotin-3'.

Суспензию, содержащую известное количество клеток указанных микроорганизмов в 10 мМ имидазол-глициновом буфере, pH 8,5, содержащем 0,1% Твин-20, 1% ПВП, 0,1 нМ фрагмента человеческой митохондриальной ДНК (используемой в качестве положительного контроля) и 1 мкМ биотинилированных олигонуклеотидов-адаптеров, диспергировали ультразвуком в течение 30 с при мощности излучателя 100%. Далее образцы инкубировали при 100 °С в течение 30 с и сразу использовали для анализа. В ходе ультразвуковой обработки клетки микроорганизмов лизировали, геномная ДНК высвобождалась и фрагментировалась, и образовавшиеся фрагменты в ходе дальнейшего нагревания плавилась с образованием одноцепочечных ДНК. Таким образом, на данном этапе работы был реализован вариант пробоподготовки двухцепочечной ДНК, не включающий использования блокирующих олигонуклеотидов.

3.3.2. Проведение гибридизационного анализа и определение предела обнаружения одноцепочечных фрагментов ДНК

Основой разрабатываемой тест-системы для ультрачувствительного экспресс-анализа фрагментов ДНК являются микрочипы на основе мембраны из регенерированной целлюлозы с иммобилизованными на её поверхности олигонуклеотидами. Как уже указывалось, такие микрочипы имеют существенное преимущество: благодаря ионной проводимости целлюлозной мембраны можно проводить электрофоретическое концентрирование анализируемых фрагментов, что многократно повышает чувствительность метода и экспрессность анализа. Однако ковалентная иммобилизация олигонуклеотидов на целлюлозной мембране не описана в литературе, поэтому она была исследована на первом этапе работы. В табл. 14 суммированы результаты, полученные для различных способов активации поверхности мембраны.

Таблица 14. Значения сигнала и фона в модельном гибридизационном анализе для различных способов изготовления микрочипов.

Метод	Сигнал, частиц/мм ²	Фон, частиц/мм ²
1. EDC / NHS	> 5000	1200 ± 400
2. K ₂ Cr ₂ O ₇ /H ⁺	> 5000	240 ± 160
3. Цианурхлорид в толуоле	> 5000	<10
4а. Поливиниловый спирт /глутаровый альдегид	2000 ± 600	90 ± 60
4б. Окисленный периодатом декстран/дигидразид адипиновой кислоты	> 5000	<10

4в. Термически сшитая карбоксиметилцеллюлоза	> 5000	<10
5. Плазмохимическая обработка	900 ± 200	<10

Очевидно, что методы с использованием кросс-линкеров (1) или окислителей (2) приводят к значительной неспецифической адгезии МЧ. Это связано, вероятно, с нарушением структуры свободных полимерных цепей целлюлозы в поверхностном слое, которые обеспечивают низкую адгезию целлюлозных мембран [62]. Методы, основанные на образовании плёнки полимера на поверхности мембраны (4), дают высокие значения сигнала при низких значениях фона, за исключением пленки из поливинилового спирта, сшитой глутаровым альдегидом. Однако лучший результат получен при использовании способа, основанного на активации поверхности целлюлозы действием 1%-ного раствора цианурхлорида. Его достоинствами являются техническая простота, скорость, достигаемые высокие значения плотности иммобилизации и низкая величина неспецифической адгезии. Именно метод 3 был использован в дальнейшей работе.

В первую очередь, была определена возможность потери анализируемой ДНК за счёт её "застревания" в мембране, являющейся подложкой микрочипа. Хотя номинальное значение "cutoff" мембраны, используемой для изготовления микрочипов, составляет 3,5 кДа, что на порядок меньше молекулярной массы самого маленького используемого в работе одноцепочечного фрагмента ДНК, нельзя исключить проникновение фрагментов ДНК вглубь мембраны под действием электрического поля. В результате исследования проницаемости мембраны для молекул флуоресцентно-меченного олигонуклеотида показано, что возможные потери не превышают 1 фмоль.

Количественной характеристикой, по которой оценивали эффективность модельной тест-системы, являлся ПрО - минимальная концентрация фрагмента ДНК, приводящая к положительному результату анализа с заданным уровнем статистической достоверности, составляющим не менее 0,99. Положительный результат анализа определяли на основании расчёта соотношения сигнал/шум по плотности связанных на микрочипе магнитных частиц в активных и неактивных (т.е. не содержащих иммобилизованных зондов) зонах. В ходе экспериментов были оптимизированы следующие условия проведения анализа:

- концентрация адаптера - 1 мкМ;
- скорость потока образца - 30 мкл / мин;
- величина концентрирующего напряжения - 100 В;
- скорость потока суспензии магнитных частиц при сканировании - 20 мкл / мин;
- продолжительность сканирования - 1 мин;
- концентрация магнитных частиц в суспензии - 0,1 мас. %.

Для выбора наиболее эффективного способа гибридационный анализ проводили с помощью двух различных методик (рис. 30). Согласно варианту **1**, определяемый фрагмент ДНК электрофоретически концентрировался вблизи поверхности ДНК-микрочипа и с

вязывался на поверхности за счёт гибридизации с иммобилизованным на микрочипе олигонуклеотидным зондом. Затем поверхность микрочипа сканировали МЧ с детектирующими олигонуклеотидами, которые гибридизовались с определяемой последовательностью, и регистрировали места связывания аналита на микрочипе. Согласно варианту **2**, непосредственно перед анализом к образцу добавляли раствор биотинилированного олигонуклеотида-адаптера в концентрации > 1 мкМ. Далее концентрированию на микрочипе подвергался продукт гибридизации аналита с адаптером, после чего биотиновая метка выявлялась сканированием МЧ, покрытых стрептавидином, при одновременном действии магнитного поля.

Установлено, что вариант **1** малоэффективен, и даже при концентрации определяемого фрагмента ДНК 10 нМ интенсивность сигнала лишь незначительно превышает фон. Это можно объяснить тем, что анализируемый фрагмент ДНК должен успеть установить комплементарные взаимодействия с детектирующим олигонуклеотидом, иммобилизованным на магнитной частице, за время её движения вдоль поверхности микрочипа. Известно, что отжиг ДНК является сравнительно продолжительным многостадийным процессом, занимающим время до секунд (для олигонуклеотидов длиной 20-30 оснований) [210]. При скорости потока 10 мкл / мин магнитная частица движется вдоль поверхности со скоростью ~ 100 мкм / с. С учётом характерного расстояния, при котором фрагменты ДНК имеют возможность отжечься, ~ 10 нм, время для гибридизации составляет всего $\sim 0,1$ мс. Поэтому движущиеся магнитные частицы не успевают детектировать связанный на микрочипе анализируемый фрагмент ДНК. В то же время необходимое уменьшение скорости потока суспензии магнитных частиц в 10 раз приводит к пропорциональному увеличению продолжительности накопления сигнала, что существенно повышает общее время анализа.

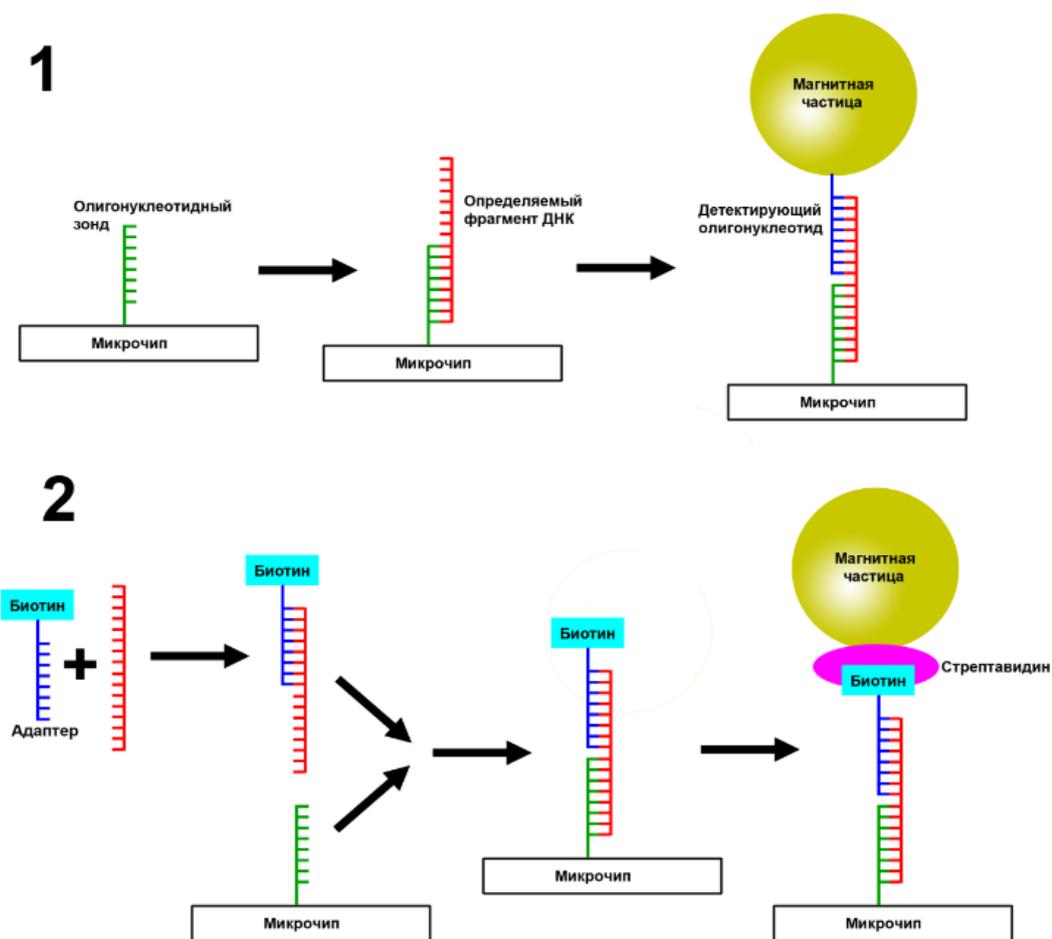


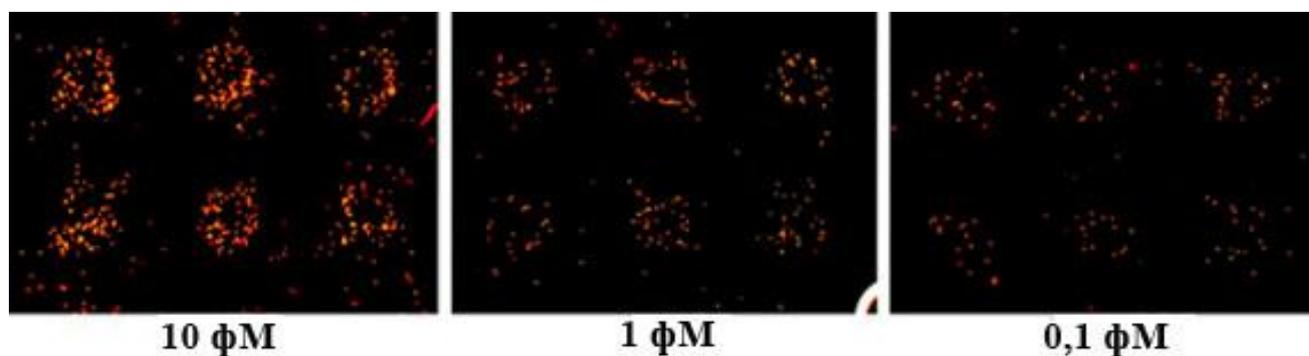
Рис. 29. Два варианта проведения анализа: 1) связанный на микрочипе анализируемый фрагмент ДНК обнаруживается МЧ, покрытыми детектирующими олигонуклеотидами; 2) перед анализом исследуемый фрагмент ДНК связывается с биотинилированным олигонуклеотидом-адаптером, полученный комплекс выявляется МЧ, покрытыми стрептавидином.

По сравнению с работой [208], в которой связывание частиц с сенсором происходит за счёт гибридизации, применение биотинилированных адаптеров позволило ускорить процесс. В то время как цепи ДНК отжигаются с константой скорости $10^5-10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (при концентрации соли 0,5 М) [211, 212] и еще медленнее в условиях низкой ионной силы [213], комплекс стрептавидин-биотин формируется с константой скорости $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [214]. Дополнительным преимуществом использования биотиновых меток является возможность одновременного обнаружения нескольких аналитов с помощью одного вида частиц, как было описано ранее для мультиплексного иммуноанализа [60]. Таким образом, при использовании метода 2 все комплементарные взаимодействия к моменту начала сканирования поверхности МЧ уже установлены, а связывание МЧ происходит за счёт быстрого образования прочной связи биотин-стрептавидин.

Во всех экспериментах объём образца составлял 100 мкл. При увеличении объёма до 1 мл наблюдали увеличение интенсивности сигнала, соответствующее повышению концентрации

фрагмента ДНК в образце в 10 раз. Примеры результатов гибридационного анализа для различных концентраций модельного одноцепочечного фрагмента ДНК представлены на рис. 30А. Для сравнения на рис. 30Б показаны результаты анализа, проведенного в тех же условиях, но без применения электрофоретического концентрирования аналита.

А



Б

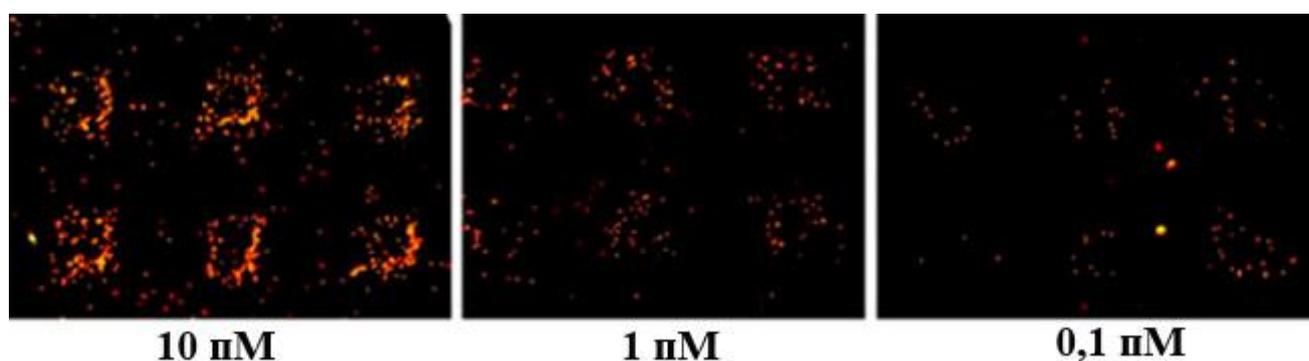


Рис. 30. Результаты гибридационного анализа для различных концентраций определяемого модельного фрагмента ДНК длиной 70 оснований: А) с применением электрофоретического концентрирования аналита. Б) без электрофоретического концентрирования аналита. В каждом случае представлен репрезентативный фрагмент поверхности микрочипа, содержащий 6 активных зон. Объем образца - 100 мкл.

По зависимости интенсивности сигнала (среднее число связанных МЧ в рабочей зоне микрочипа) от концентрации одноцепочечного фрагмента ДНК был построен градуировочный график, который имеет сигмоидную форму с динамическим диапазоном около 4-х порядков и выходом сигнала на насыщение при концентрации аналита ~ 1 пМ (рис. 31). В условиях электрофоретического концентрирования ПрО одноцепочечных фрагментов ДНК длиной 70 и 893 оснований составил $\sim 0,1$ фМ, что соответствует 6000 молекул аналита в образце. При этом время анализа не превышало 10 мин.

Следует отметить, что без электрофоретического концентрирования ПрО повысился в 1000 раз. Таким образом, технологическое усложнение анализа, связанное с введением электрофореза,

представляется вполне оправданным. На основании этого значения можно рассчитать эффективность электрофоретического концентрирования аналита.

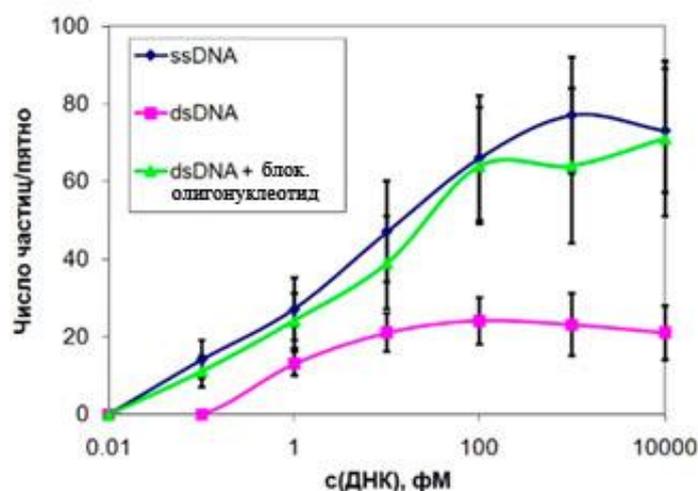


Рис. 31. Зависимость сигнала в "активном" гибридационном анализе от концентрации определяемых одноцепочечных (синяя кривая) и двухцепочечных фрагментов ДНК (зелёная кривая - в присутствии блокирующих олигонуклеотидов, сиреневая – в отсутствие блокирующих олигонуклеотидов). Пределы погрешностей соответствуют 2.5 x CO.

В наших экспериментальных условиях микрочип, содержащий около десяти зон размером $100 \times 100 \text{ мкм}^2$, находился в проточной ячейке шириной 1,5 мм и высотой 100 мкм. Следуя модели диффузионно-контролируемой доставки аналита на поверхность сенсора [215], можно заключить, что в отсутствие электрического поля из 100 фМ раствора на микрочипе захватываются $\sim 10^4$ молекул. Как следует из рис. 30 (Б), значение сигнала в случае анализа без электрофореза соответствует сигналу, полученному с помощью электрофореза образца 0,1 фМ раствора, содержащего около 6000 молекул аналита. Можно предположить, что количество молекул аналита, захваченных на микрочипе, также одинаково. Таким образом, при электрофоретическом сборе каждая молекула аналита в образце захватывается на микрочипе. Можно также оценить долю молекул аналита, связавшихся с магнитными частицами. Показано, что при анализе 100 мкл 0,1 мМ раствора в одной зоне микрочипа связываются 600 фрагментов ДНК. В этом случае около 20 МЧ проявляются в каждой зоне, что означает, что реагирует только 1/30 часть от всех молекул аналита. Другие, вероятно, стерически недоступны из-за неровной поверхности микрочипа. Некоторый фоновый сигнал наблюдался при высокой концентрации аналита, но при низких концентрациях были видны только 1 - 3 частицы на площади $100 \times 100 \text{ мкм}^2$ (рис. 30). Таким образом, столь низкий фон не влияет на нижнюю границу динамического диапазона. Другим фактором, влияющим на динамический диапазон, является неравномерное покрытие рабочей зоны частицами при высоких концентрациях аналита, что обычно наблюдается при сканировании

микрочипа МЧ [22]. Надо отметить, что в таких анализах никогда не достигается максимальная плотность частиц на поверхности. Тот факт, что при высокой плотности частицы невозможно точно подсчитать, приводит к сильным колебаниям измеренных значений сигнала и может уменьшить динамический диапазон.

Аналогичные градировочные графики с одинаковым динамическим диапазоном были ранее получены для различных иммунохимических тест-систем, использующих магнитные метки. Значения ПрО с точностью до порядка также совпадают. Данное сходство между гибридизацией и иммунохимическим анализом свидетельствует об общности факторов, регулирующих связывание магнитных частиц с микрочипом. Эти факторы, по-видимому, определяются такими характеристиками как плотность иммобилизации фрагментов ДНК, их стерическая доступность, шероховатость поверхности микрочипа и частиц. В то же время природа специфических связей, будь то комплекс антиген-антитело или ДНК-дуплекс, не играет существенной роли. Основное различие, по-видимому, заключается в кинетическом факторе: как обсуждалось выше, для формирования дуплекса требуется больше времени по сравнению с комплексами стрептавидин-биотин и антиген-антитело.

3.3.3. Детекция двухцепочечных фрагментов ДНК на микрочипах

Детекция двухцепочечных фрагментов ДНК представляет намного больший практический интерес по сравнению с одноцепочечными. Чтобы адаптировать описываемый метод к детекции двухцепочечных ДНК, требуется дополнительная пробоподготовка, нацеленная на генерацию одноцепочечных фрагментов в нужных участках мишени. В настоящей работе были исследованы два способа получения таких фрагментов:

1. Плавление двухцепочечной ДНК нагреванием образца до 100 °С в течение 30 с, после которого образец сразу использовали для анализа.
2. Плавление двухцепочечной ДНК нагреванием образца до 100 °С в течение 30 с в присутствии большого избытка (1 мкМ) блокирующих олигонуклеотидов.

В первом варианте предполагалось, что вследствие низкой концентрации ДНК в образце, рекомбинация цепей будет происходить медленнее, чем их гибридизация на микрочипе. Действительно, учитывая максимально возможную константу скорости ассоциации $k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, при фемтомолярной концентрации ДНК характерное время, необходимое для отжига комплементарных цепей, составляет $t > 10^8 \text{ c}$. Однако при анализе двухцепочечной ДНК с ее предварительным плавлением наблюдалось существенное снижение интенсивности сигнала, а также увеличение ПрО на порядок - до 1 фМ (рис. 31). В этом случае различие в интенсивности сигнала между одинаковыми концентрациями одно- и исходно двухцепочечных фрагментов было больше при высоких концентрациях аналита. Предельное значение величины сигнала в случае двухцепочечной ДНК оказалось в 3-4 раза ниже, чем в случае одноцепочечной, а динамический

диапазон снизился до 2-х порядков. Вероятно, после плавления двухцепочечной ДНК в отсутствие блокирующих олигонуклеотидов существенная часть образующихся одноцепочечных фрагментов успевает отжечься обратно, причём чем выше концентрация ДНК в образце, тем быстрее протекает отжиг. В результате основная часть аналита не может принять участия в анализе.

В связи с этим была разработана стратегия блокирования второй цепи путём денатурации молекул ДНК в присутствии избытка (1 мкМ) блокирующих олигонуклеотидов, соответствующих определённым участкам (рис. 32).

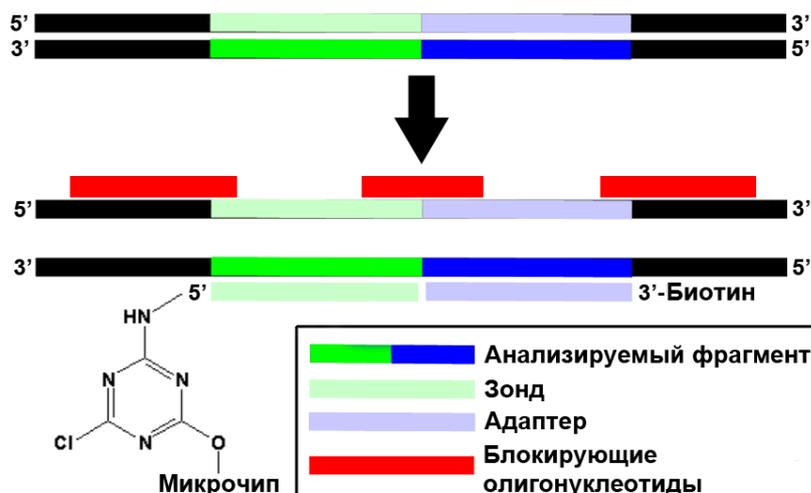


Рис. 32. Схема применения блокирующих олигонуклеотидов для анализа двухцепочечных фрагментов ДНК.

Их последовательности были составлены таким образом, чтобы они гибридизовались с отдельными участками одной цепи денатурированной ДНК, препятствуя их обратному отжигу, и одновременно не влияли на гибридизацию с олигонуклеотидными зондами на микрочипе [208]. В случае добавления блокирующих олигонуклеотидов к образцу перед плавлением Про двухцепочечного фрагмента ДНК составил 0,1 фМ (см. рис. 31). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что блокирующие олигонуклеотиды полностью защищают анализируемый участок последовательности ДНК от отжига на комплементарную цепь. Добавление к образцу перед плавлением каждого из блокирующих олигонуклеотидов по отдельности не влияло на интенсивность сигнала. Следовательно, оптимальной комбинацией блокирующих олигонуклеотидов, обеспечивающей защиту анализируемого участка последовательности ДНК, является их полный набор.

В итоге, разработанный метод "активного" гибридационного анализа был адаптирован для детекции двухцепочечных фрагментов ДНК без существенного ухудшения аналитических характеристик метода - чувствительности, времени проведения анализа (дополнительная стадия

плавления ДНК и отжига блокирующих олигонуклеотидов занимает не более одной минуты и существенно не влияет на общее время анализа) и динамического диапазона. Примеры анализа модельного двухцепочечного фрагмента ДНК с разными способами пробоподготовки приведены на рис. 33.

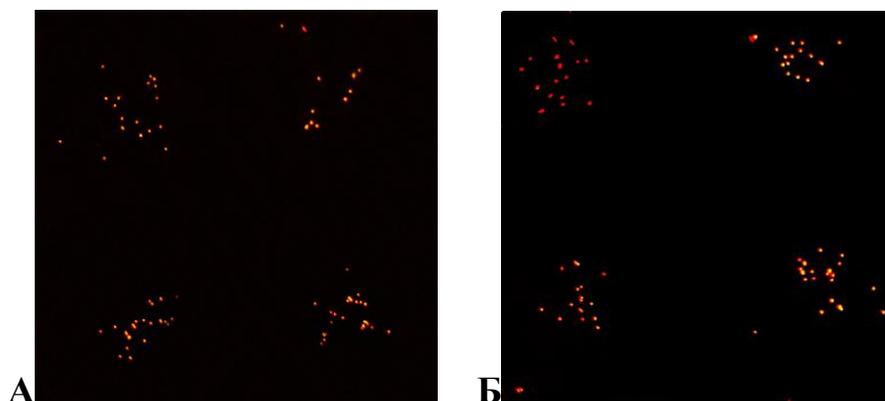


Рис. 33. Результат гибридационного анализа двухцепочечного модельного фрагмента ДНК длиной 70 пар оснований (п.о.) А) без блокирующих олигонуклеотидов, концентрация фрагмента ДНК - 1 фМ. Б) с применением блокирующих олигонуклеотидов, концентрация фрагмента ДНК - 0,1 фМ. Объём образца - 100 мкл, Представлены репрезентативные фрагменты поверхности микрочипа, содержащие 4 активные зоны.

Согласно литературным данным [216], механическая прочность коротких (12-15 п.о.) ДНК-дуплексов может уменьшаться на ~10% при уменьшении длины на одну п.о. или при внесении в последовательность одной некомплементарной замены. Возникает вопрос, может ли разница в силе дуплексов использоваться для их распознавания с помощью гидродинамического потока, как для дискриминации комплексов антиген-антитело? С этой целью был изготовлен многокомпонентный микрочип, содержащий иммобилизованные олигонуклеотиды, частично или полностью комплементарные тестовому олигонуклеотиду 5'-ССТТАГСТСТСАССАТСТСТ-*biotin*-3':

- а) 12-членный олигонуклеотид, полностью комплементарный тестовому, последовательность: 5'-TGAGAGCTAAGG- NH₂-3', в 3-х повторах;
- б) 11-членный олигонуклеотид, отличающийся от а) удалением первого нуклеотидного остатка, «11-mer», последовательность: 5'-GAGAGCTAAGG-NH₂-3';
- в) 12-членный олигонуклеотид, отличающийся от а) заменой первого основания, последовательность: 5'-GGAGAGCTAAGG- NH₂-3';

г) 12-членный олигонуклеотид, отличающийся от а) заменой седьмого основания, последовательность: 5'-TGAGAGATAAGG-NH₂-3'.

Короткие последовательности были выбраны для того, чтобы сделать максимальным влияние одного несоответствия на устойчивость дуплекса. Для стабилизации дуплексов ДНК использовали высокую ионную силу, соответствующей концентрации соли 150 мМ. Увеличивая скорость потока, можно применить контролируемую гидродинамическую силу к частицам, связанным с микрочипом через ДНК-дуплексы. Величину сдвиговой скорости, создаваемой потоком буфера, варьировали от 20 до 200 с⁻¹. При сдвиговой скорости 200 с⁻¹ все МЧ удалялись с поверхности микрочипа. Пример изображения микрочипа при промежуточном значении сдвиговой скорости 80 с⁻¹ приведён на рис. 34Б. Предполагалось, что при определённых значениях сдвиговой скорости более короткие или не полностью комплементарные дуплексы будут механически разрушаться, что приведёт к удалению большей части МЧ, в то время как более прочные (более длинные или полностью комплементарные) дуплексы останутся неизменными. Действительно, как следует из рис. 35, магнитные метки, связанные с полностью комплементарным 12-членным олигонуклеотидом, удалялись с поверхности при более высоких значениях сдвиговой скорости, в то время как более короткие или несовершенные дуплексы разрушались легче. Однако для всех исследованных последовательностей зависимости сигнала от сдвиговой скорости были статистически неразличимы. Таким образом, силовая дискриминация единичных замен и делеций в последовательности ДНК оказалась невозможной. Вероятно, это связано с большими вариациями силы связывания магнитных частиц с поверхностью чипа, существенно превосходящими различия в прочности дуплексов, отличающихся по длине на 1 нуклеотидный остаток. Эти вариации могут быть объяснены неровностями на поверхности микрочипа и МЧ, приводящими к различиям в площади контакта частиц с поверхностью; кооперативными эффектами, из-за которых частицы, удерживаемые большим числом дуплексов, оказываются связаны более прочно; неравномерностью покрытия поверхности микрочипа иммобилизованными олигонуклеотидами и др. Чтобы обеспечить эффективную силовую дискриминацию последовательностей ДНК, они должны иметь более существенные различия по прочности, например, различаться по длине на два нуклеотида и более. Однако в таком случае силовая дискриминация уже не представляет практического интереса, так как такие последовательности могут быть легко детектированы обычными методами, в которых гибридизация и диссоциация дуплексов происходят в условиях, близких к равновесным.

А

12 н.о. ошибка на конце	12 н.о. ошибка посередине	11 н.о.
		12 н.о.
	12 н.о.	12 н.о.

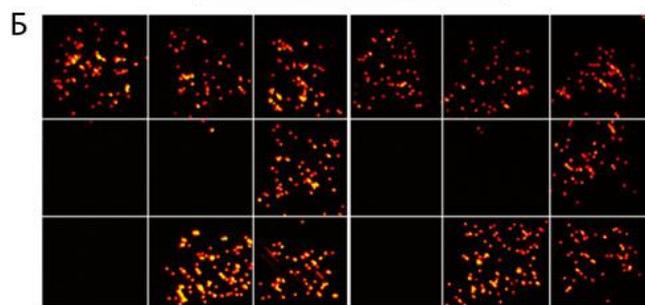


Рис. 34. (А) Дизайн многокомпонентного ДНК-микрочипа для исследования силовой дискриминации ДНК-дуплексов. (Б) Изображение микрочипа со связанными магнитными частицами, полученное при сдвиговой скорости 80 с^{-1} .

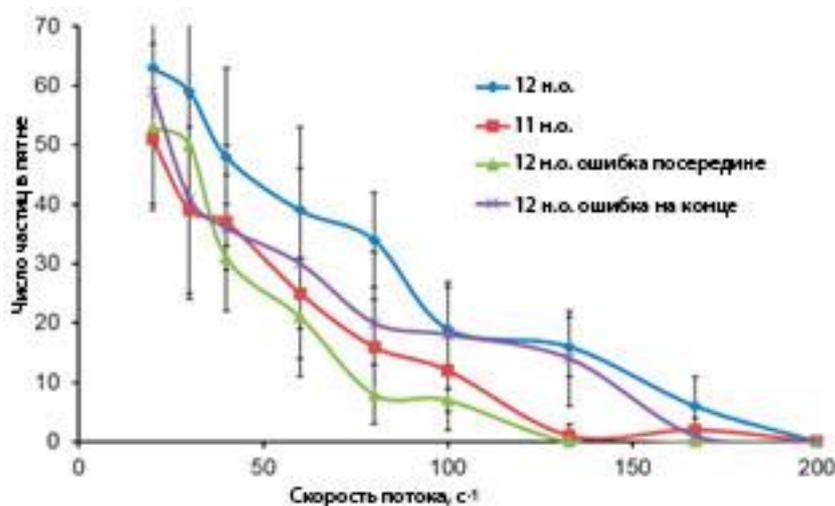


Рис. 35. Зависимость интенсивности сигнала в модельном гибридационном анализе от сдвиговой скорости для частично и полностью комплементарных последовательностей ДНК с разным числом нуклеотидных остатков (н.о.). Пределы погрешностей соответствуют $2.5 \times \text{CO}$.

Альтернативным методом дискриминации близких по первичной структуре последовательностей ДНК в данной экспериментальной системе является воздействие электрического поля на ДНК-дуплексы на микрочипе. Время жизни дуплекса может быть оценено в соответствии с известными теоретическими моделями [217]: например, для 12-членного олигонуклеотида в 150 мМ растворе КСl период полураспада составляет около 150 с, а для 11-членного - около 130 с. Конструкция используемой проточной ячейки позволяет прикладывать

электрическое поле к микрочипу и электрофоретически удалять с его поверхности цепи ДНК, образовавшиеся при диссоциации дуплексов, делая невозможным их обратный отжиг на микрочипе. При последующем сканировании микрочипа МЧ можно оценить количество оставшихся на микрочипе дуплексов и, возможно, дискриминировать близкие последовательности ДНК по времени жизни дуплексов. Чтобы проверить возможность реализации этой схемы, был поставлен следующий эксперимент. Микрочип инкубировали с избытком 10 мкМ тестового биотинилированного олигонуклеотида в PBS в течение 30 мин и затем закрепляли в проточной ячейке. Дизайн микрочипа и последовательность тестового олигонуклеотида были указаны выше. В проточной ячейке микрочип подвергали краткосрочному (30-180 с) действию электрического поля (напряжение 100 В, отрицательный электрод под микрочипом), в результате чего образовавшиеся при диссоциации дуплексов цепи ДНК удалялись с поверхности. После выключения поля производили быстрое (не более 20 с) сканирование микрочипа МЧ, покрытыми стрептавидином. Зависимость полученного сигнала от накопленного времени действия электрического поля приведена на рис. 36.

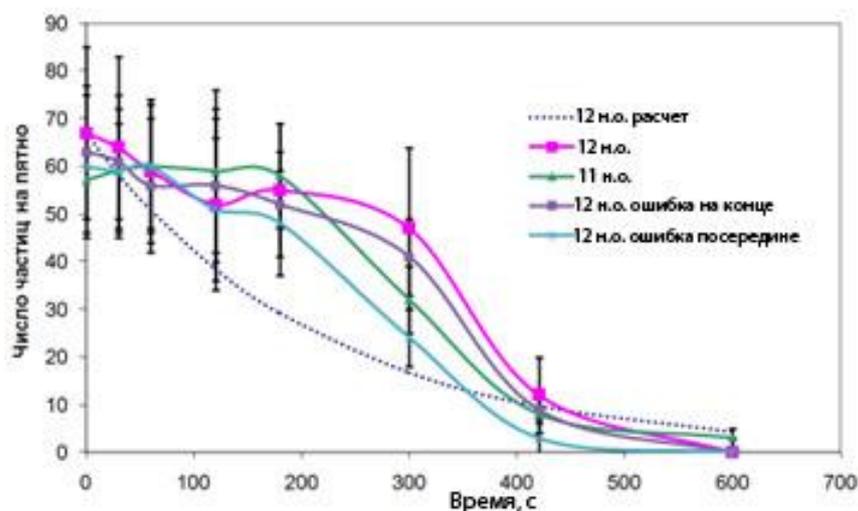


Рис. 36. Зависимость интенсивности сигнала в модельном гибридном анализе от времени воздействия электрического поля для частично и полностью комплементарных последовательностей ДНК различной длины. Пунктиром показана теоретическая зависимость доли недиссоциированного 12-членного ДНКдуплекса от времени, рассчитанная по значению периода полураспада 150 с. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times \text{CO}$.

Как и в предыдущем случае, полученные зависимости характеризуются большим разбросом значений сигнала, который делает невозможным дискриминацию использованных последовательностей ДНК. Кроме того, здесь, по-видимому, проявляется эффект кооперативного удерживания магнитной частицы несколькими ДНК-дуплексами: когда количество недиссоциированных дуплексов велико (каждая частица удерживается на поверхности большим

числом комплементарных взаимодействий), его уменьшение в течение первых ~200с с начала действия электрического поля не сказывается на числе удерживаемых МЧ. При дальнейшем уменьшении количества недиссоциированных дуплексов сигнал резко падает до нуля. Очевидно, что такая нелинейная зависимость сигнала от количества дуплексов на поверхности микрочипа дополнительно затрудняет дискриминацию близких последовательностей ДНК.

Предлагаемая биоаналитическая система позволяет исследовать наномеханику ДНК принципиально новым способом - создавая длительную, до нескольких минут, нагрузку на ДНК-дуплексы за счёт действия гидродинамической силы со стороны потока жидкости на МЧ, удерживаемые дуплексами на поверхности микрочипа, и измеряя вероятность разрыва двойной спирали. Полученные в различных условиях (температура, ионная сила, концентрация формамида) зависимости сигнала от сдвиговой скорости приведены на рис. 37.

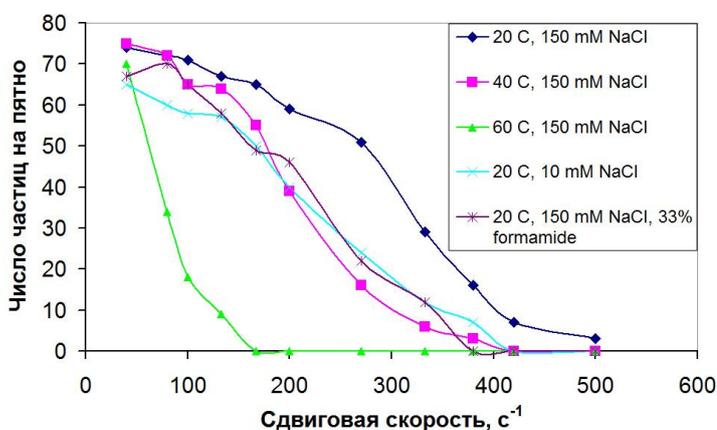


Рис. 37. Зависимость интенсивности сигнала в модельном гибридном анализе от сдвиговой скорости в различных условиях. Для наглядности пределы погрешностей, составлявшие 10-15% от величины сигнала, не показаны.

Термодинамика ДНК хорошо изучена, в том числе, детально исследовано влияние на стабильность ДНК-дуплексов ионной силы и концентрации хаотропных агентов, таких как формамид. Известно, что в процессе плавления уменьшение концентрации однозарядного иона в 10 раз эквивалентно повышению температуры на 16,6 °C, а добавление 1%-ного формамида эквивалентно повышению температуры на 0,62 °C [218]. Таким образом, с точки зрения термодинамической устойчивости ДНК-дуплекса к диссоциации повышение температуры с 20 °C до 40 °C эквивалентно уменьшению концентрации соли со 150 мМ до 10 мМ или добавлению 33% формамида. Представленные на рис. 37 данные по механической прочности ДНК-дуплексов согласуются с этими оценками: зависимости сигнала от сдвиговой скорости, полученные при 40 °C при пониженной до 10 мМ концентрации NaCl, а также в 33%-ном формамиде совпадают с высокой точностью. В то же время в условиях, соответствующих большей термодинамической устойчивости дуплексов (150 мМ NaCl, 20 °C, 0% формамида), их механическая прочность также

оказывается более высокой. При высокой температуре, 60 °С, близкой к температуре плавления данной последовательности (74 °С), механическая прочность дуплексов низка. Таким образом, можно заключить, что механическая прочность ДНК-дуплексов в реализованных в настоящей работе условиях длительного нагружения находится в прямой зависимости от их термодинамической устойчивости.

3.3.4. Применение "активного" гибридационного анализа для мультиплексного определения *E. coli*, *B. cereus* и *M. neoaurum* по специфическим ДНК-маркерам

В данной части работы продемонстрировано прямое мультиплексное обнаружение бактериальной геномной ДНК в клеточной культуре. В качестве модели были выбраны следующие микроорганизмы: *M. neoaurum*, похожий на возбудителя туберкулеза, *B. cereus*, который может служить моделью возбудителя сибирской язвы, и кишечная палочка. Короткие (~ 1 тыс.п.о.) фрагменты геномной ДНК получали обработкой ультразвуком бактериальных клеток. Дизайн микрочипа для мультиплексного определения трех микроорганизмов представлен на рис. 38А. Показано, что предел обнаружения для каждого из микроорганизмов составляет ~10⁴ клеток в объеме образца 100 мкл (рис. 38Б). Предполагая, что каждая клетка содержит одну копию гена-мишени, это соответствует чувствительности ~0,1 фМ, что совпадает с оценкой чувствительности, приведенной выше для dsДНК. Таким образом, наличие в образце мешающих веществ, таких как денатурированные белки, фрагменты биологических мембран и клеточных стенок, а также большой избыток фрагментов ДНК и РНК, не влияет на чувствительность анализа.

На рис. 39 продемонстрирована высокая специфичность анализа: ложноположительных сигналов не наблюдается даже при концентрации 10⁷ клеток / 100 мкл. Надо отметить, что высокая специфичность анализа определяется не только последовательностями зонда и адаптера, но также последовательностями блокирующих олигонуклеотидов.

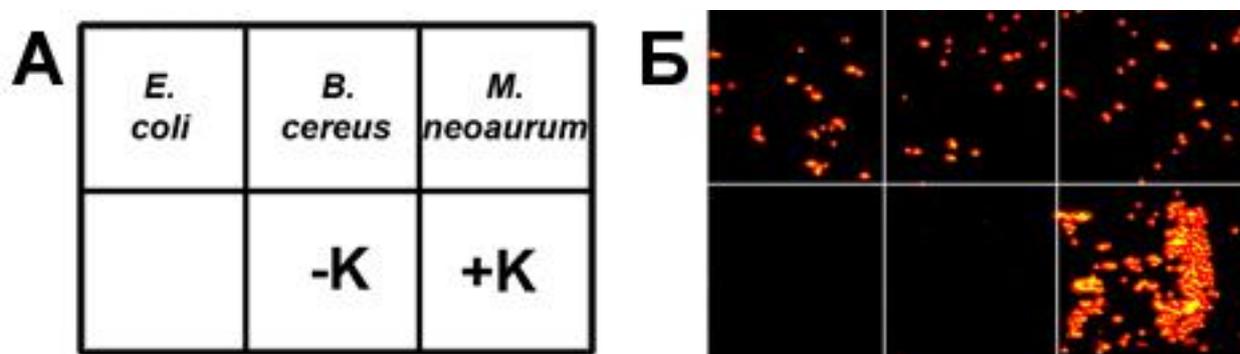


Рис. 38. (А) Дизайн микрочипа для одновременного обнаружения трёх микроорганизмов: *E. coli*, *D. cereus* и *M. neoaurum*. (Б) Результат гибридационного анализа образца объемом 100 мкл,

содержащего 10^4 клеток каждого из микроорганизмов. Представлен фрагмент поверхности микрочипа. Размер рабочих зон - 100 мкм.

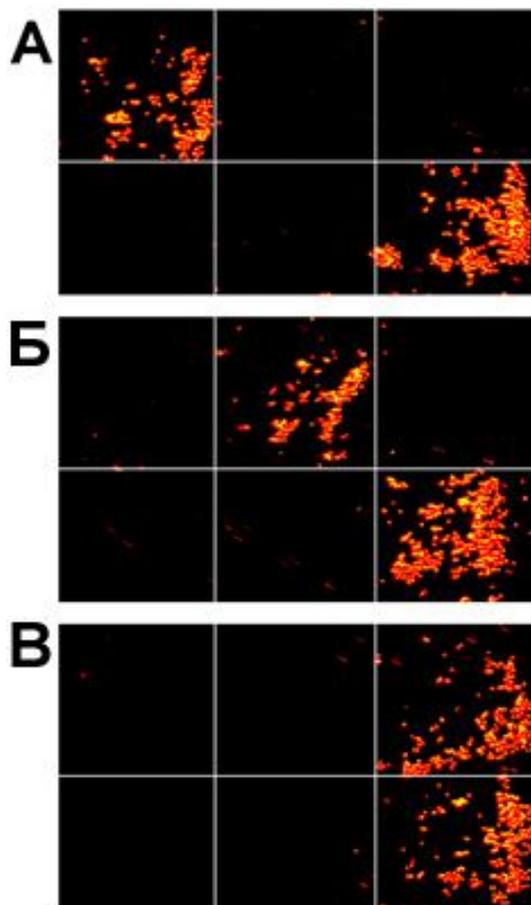


Рис. 39. Иллюстрация специфичности мультиплексного определения трех микроорганизмов. В каждом эксперименте использовали 100 мкл образца, содержащего 10^7 клеток одного из микроорганизмов: (А) *E. coli*, (Б) *B. cereus* и (В) *M. neoaurum*. Дизайн микрочипа показан на рис. 38А. Представлены фрагменты поверхности микрочипа, размер зон - 100 мкм.

3.3.5. Выводы к разделу 3.3.

Результатом работы стало создание принципиально нового метода "активного" гибридного анализа, позволяющего обнаружить до 6000 молекул ДНК в 100 мкл раствора ($\sim 0,1$ фМ) за несколько минут без амплификации мишени, сигнала или зонда. Такая высокая чувствительность достигается с помощью активного способа проведения анализа под действием направленной силы. Хотя разработанный метод имеет более высокий предел обнаружения по сравнению с ПЦР, он обладает рядом существенных достоинств, такими как неограниченная мультиплексность, определяемая только числом зондов на микрочипе, которое может составлять до нескольких тысяч, и экспрессность анализа. Он может найти применение в тех областях, где

использование ПЦР затруднено в силу ограничений по времени анализа, мультиплексности и др., в том числе для медицинской диагностики [219]. Этот метод также может быть востребован для изучения наномеханики ДНК, поскольку он обеспечивает новый способ силовой нагрузки на ДНК-дуплексы. В традиционной атомно-силовой спектроскопии сила разрыва дуплекса измеряется при заданной скорости нагружения [220]. Вместо этого, с помощью сдвигового потока, действующего на связанные на поверхности частицы, можно измерять скорости диссоциации цепей ДНК под постоянным действием контролируемой силы. Еще одним вариантом использования разработанного метода является изучение процесса гибридизации - плавления ДНК, контролируемого действием электростатической силы на фрагмент ДНК [221]. Этот подход может быть полезен для дальнейшего повышения специфичности анализа.

ГЛАВА 4. НОВЫЕ МЕТОДЫ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОАНАЛИЗА БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА, ПРИГОДНЫЕ ДЛЯ ШИРОКОМАСШТАБНОГО ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

4.1. Низкоадгезивный субстрат для микрочипов на основе плёнки из сшитой карбоксиметилцеллюлозы

Для автоматизации процесса анализа биомакромолекул требуются микрочипы на твёрдой основе, поэтому развитие технологии изготовления эффективных подложек представляет большой практический интерес. Эта часть работы была инициирована проектом Фонда Сколково «Инноград-Пушино» по созданию автоматической установки для обнаружения особо опасных инфекций и патогенов. Основным элементом подобных автоматизированных систем является микрочип на твердой подложке. Использование суперпарамагнитных частиц для быстрого и высокочувствительного обнаружения сигнала в анализах на микрочипах предъявляет к подложкам повышенные требования, особенно в отношении гладкости и адгезионных свойств поверхности. Поскольку большинство коммерческих подложек таким требованиям не удовлетворяют, был разработан новый тип субстрата для микрочипов с низкой адгезией к МЧ с белковым покрытием-термически сшитая карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ). Его эффективность продемонстрирована в экспериментах по обнаружению трех бактериальных токсинов: холерного токсина, стафилококкового энтеротоксина А и токсина токсического шока.

Суперпарамагнитные частицы широко используются в качестве меток в иммуноанализах на основе микрочипов и для обнаружения ДНК [19, 22, 44, 60, 62, 208, 222-224]. Магнитные частицы, связанные с поверхностью микрочипа специфическими межмолекулярными связями, могут быть дополнительно обнаружены магнитоэлектронным детектором [57] или под микроскопом с темнопольным осветителем [22, 60]. Процедура обнаружения, использующая МЧ, может быть выполнена многими способами: от простейшего «двухэтапного» метода до сканирования поверхности микрочипа частицами со сдвиговым потоком. Основными преимуществами последнего метода являются его скорость и чувствительность. Как правило, вся процедура занимает около 1 минуты и обеспечивает чувствительность к отдельным молекулам, поскольку одна связь антиген-антитело способна удерживать частицу на поверхности [44].

Детекция сигнала с помощью МЧ предъявляет более жесткие требования к свойствам материала микрочипа, чем ИФА и другие методы гетерогенного иммуноанализа. Это объясняется большой площадью контакта между поверхностью и частицей, где многочисленные слабые неспецифические взаимодействия (ионные, гидрофобные, силы Ван-дер-Ваальса) вступают в действие и эффективно конкурируют с сильными, но менее многочисленными специфическими

связями антиген-антитело. Именно поэтому многие обычные субстраты не могут использоваться в иммунологическом анализе, где МЧ используются в качестве меток. До сих пор сообщалось о нескольких типах субстратов, которые хорошо работали с детекцией магнитными частицами: мембраны из регенерированной целлюлозы [22, 25, 41], золото, блокированное PEG-SH после иммобилизации SH-содержащих биомолекул [206], полистирол с привитым ПЭГ [241, 242] и стеклянные слайды, покрытые нейтравидином [40, 190]. За исключением целлюлозных мембран, подготовка всех других носителей, упомянутых выше, включает сложные и дорогостоящие процедуры модификации поверхности, мало пригодные для крупномасштабного промышленного применения.

В этой части работы описан простой недорогой способ покрытия твёрдых поверхностей для производства микрочипов, которые могут использоваться в анализах, использующих детекцию с помощью магнитных частиц. Поскольку неспецифическое связывание представляет проблему и в других гетерофазных анализах с участием микро- и наночастиц, мы считаем, что описанный здесь подход может также быть полезен для уменьшения неспецифического связывания в анализах с использованием сверхпроводящих квантовых интерференционных устройств (SQUID), при обнаружении магнитного сигнала [209-213] и в других подобных методах.

4.1.1. Методы исследования

Изготовление и характеристика плёнки из КМЦ

Раствор КМЦ в воде (0,5 мас. % фильтровали через 0,2 мкм фильтр из поливинилиденфторида (Immobilon P, Sigma-Aldrich) и концентрировали на центробежном испарителе до конечной концентрации 1,5%, которую определяли путём взвешивания сухих остатков. Микроскопные стёкла очищали в течение ночи в 3%-ном $K_2Cr_2O_7$ в концентрированной H_2SO_4 , промывали водой, затем погружали в 1%-ный раствор АПТЭС в 20 об. %-ном этаноле или в 0,3%-ный водный раствор полиэтиленimina (ПЭИ) на 30 мин при комнатной температуре, опять промывали и сушили. Раствор КМЦ (5-10 мкл) наносили на рабочую зону стекла, сразу центрифугировали 1 мин при 3000 об/мин на центрифуге с модифицированным ротором и прокаливали при 140 °C в течение 2 ч. Толщину плёнки оценивали путём измерения глубины царапины с помощью интерферометра Линника. Для исследования набухания и титрования карбоксильных групп на стекле высушивали толстый (~1 мм) слой раствора КМЦ. Характеристику поверхности проводили с помощью атомно-силового микроскопа SmartSPMT-1000. Во всех сканированиях использовали режим с резонансной частотой 300-350 кГц. Среднеквадратичные значения изменения высоты поверхности определяли на участках площадью 0,5 мкм² с применением плоского вычитающего фильтра с помощью программного обеспечения Gwyddion (Чешский метрологический институт, Чехия).

Модификация поверхности и изучение неспецифической адгезии магнитных частиц к различным подложкам по методике «push - pull» и в сдвиговом потоке

Предметные стекла, покрытые АПТЭС, изготавливали, как описано выше. Альдегидные предметные стекла получали обработкой предметных стекол, покрытых АПТЭС, 2 об. %-ным раствором глутарового альдегида в течение 15 мин с последующей промывкой водой. В некоторых экспериментах полистирольные пластины и стёкла, покрытые АПТЭС или альдегидом, обрабатывали 30 мин 2%-ным раствором БСА или 2 мас. %-ным водным раствором сухого обезжиренного молока и промывали водой. Все подложки хранили в сухом виде при + 4 °С. На подложку наносили 30 мкл 1 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего различные концентрации NaCl (1-500 мМ), 1% ПВП и 0,1% Твин-20. В эту каплю добавляли 1 мкл суспензии МЧ (0,1% в том же буферном растворе) и под подложку тут же подносили магнит на 3 с. Несвязанные частицы затем удаляли магнитом с коническим наконечником, как описано в [214]. Изображение участка подложки с оставшимися на поверхности частицами регистрировали камерой, прикреплённой к микроскопу с темнопольным осветителем и рассчитывали количество частиц, находящихся на площади 1 мм².

Проточная ячейка для исследования адгезии магнитных частиц в сдвиговом потоке описана ранее в п. 1.1. Суспензию МЧ, покрытых SA (0,1 мас. % в 1 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 10 или 100 мМ NaCl, 1% ПВП и 0,1% Твин-20), вводили в проточную ячейку с помощью шприцевого насоса и собирали магнитом, помещённым под микрочип на несколько секунд, чтобы слой частиц на поверхности стал виден в микроскопе. Затем через ячейку пропускали буфер с разными скоростями потока (10 с для каждой скорости) и каждый раз поверхность фотографировали. Количество частиц, удерживаемых на фиксированной площади поверхности (приблизительно 300 × 300 мкм), подсчитывали (в % от первоначально нанесённых) и строили график зависимости количества частиц от скорости потока. Скорость сдвига, S, рассчитывали по формуле

$$S = 6Q / bh^2 \quad (4),$$

где Q - объёмная скорость потока, b и h - ширина и высота проточной ячейки.

Определение набухания плёнки из КМЦ

Набухание определяли, используя часть плёнки, отделённую от стеклянной подложки. Её размер измеряли под оптическим микроскопом до и после погружения в воду на 15 мин. Плотность поперечных связей в плёнке КМЦ рассчитывали по данным набухания с использованием уравнения Флори-Ренера [215]:

$$- [\ln(1 - v_2) + v_2 + \chi_1 v_2^2] = V_1 n [v_2^{1/3} - v_2/2] \quad (13),$$

где v_2 - объёмная доля полимера в набухшей плёнке, χ_1 - член взаимодействия Флори-Хаггинса полимера с растворителем (принимается равным 0,49 [216]), $V_1 = 18$ мл / моль - молярный объём воды, n - количество свободных (эластически активных) цепей на мл. Число поперечных связей на

единицу мономера рассчитывали как ρ / nM , где ρ - плотность КМЦ (1,6 г/мл), M - молекулярная масса мономера (203 Да).

На рис. 40 приведены значения набухания плёнки из КМЦ, прокалённой в течение 1,5 ч при разных температурах. Полная поперечная сшивка достигалась при 140 °С, и повышение температуры выше этого значения не приводило к дальнейшему уменьшению набухания.

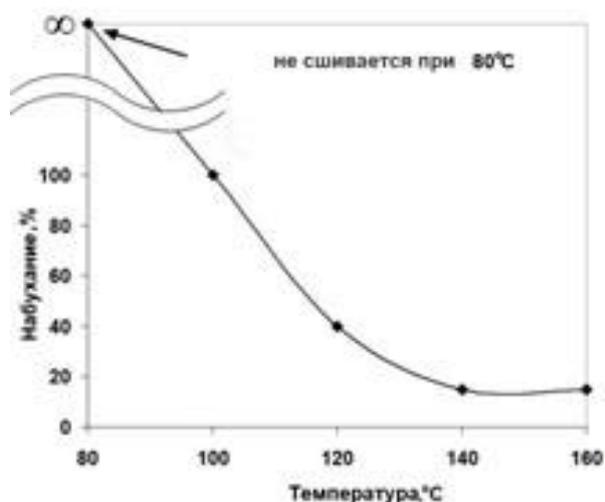


Рис. 40. Набухание плёнки из КМЦ как функция температуры.

Определение коэффициента диффузии красителя в плёнке из КМЦ и диализной мембране

Для измерения диффузии красителя кусок плёнки или мембраны помещали во влажную атмосферу, а микрокристаллы фуксина (не более 300 мкм) помещали на влажную поверхность. Коэффициент диффузии рассчитывали по скорости распространения окрашенной области, как описано в [217]. Скорость распространения цветовой зоны вокруг кристалла фуксина в плёнке из КМЦ и диализной мембране показана на рис. 41.

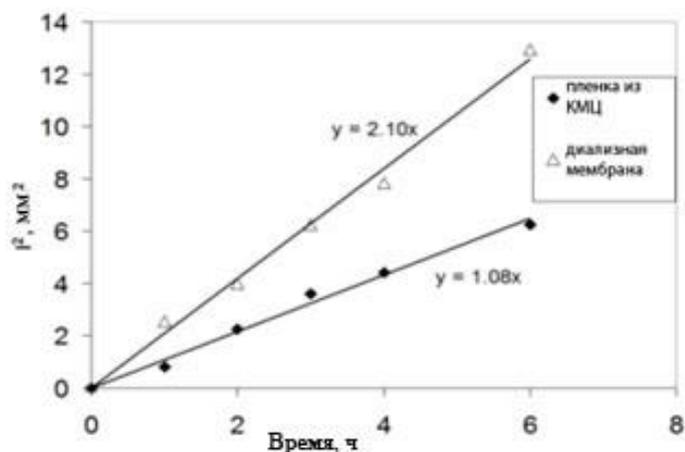


Рис. 41. Площадь окрашенной фуксином зоны, l , в зависимости от времени обработки плёнки из КМЦ и диализной мембраны с $MWCO = 3,5$ кДа.

Коэффициенты диффузии D , рассчитанные на основе этих данных по формуле $l^2 = 2Dt$, составляют $2,9 \times 10^{-4}$ мм²/с для диализной мембраны и $1,5 \times 10^{-4}$ мм²/с для плёнки из КМЦ. Таким образом, коэффициент диффузии фуксина в КМЦ-плёнке в два раза ниже, чем в диализной мембране, что свидетельствует о её низкой проницаемости

Измерение дзета-потенциала плёнки из КМЦ и модифицированных магнитных частиц

Чтобы оценить дзета-потенциал частиц, измеряли потенциал потока, ΔV , генерируемый на колонке с МЧ, как функцию приложенного давления, ΔP . Схема микроустройства собственного изготовления показана на рис. 42.

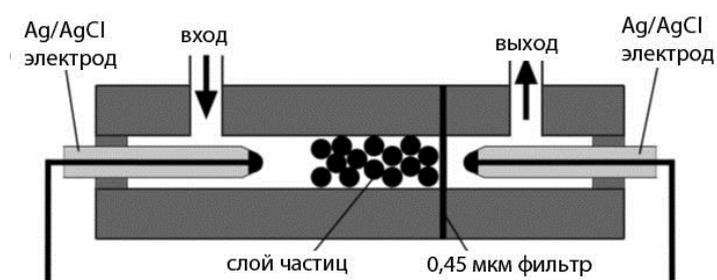


Рис. 42. Схема устройства, используемого для измерения дзета-потенциала.

Суспензию магнитных частиц (5 мкл 1 мас. %-ного раствора) помещали в толстостенную стеклянную трубку с внутренним диаметром ~ 1 мм и собирали в виде слоя толщиной ~ 100 мкм² на фильтре, разделяющем трубку на две части. Буферные растворы с различным pH (фосфатные буферы для pH 2 - 3 и 7 - 8, ацетатный буфер для pH 4 - 6) прокачивали через трубку под заданным давлением (в диапазоне 0 - 100 кПа) и измеряли потенциал потока парой электродов Ag/AgCl, расположенных на концах капиллярной трубки, как показано на рис. 42.

Из измеренной зависимости ΔV (ΔP) с помощью линейной регрессии получали коэффициент связи потенциала потока $C_s = \Delta V / \Delta P$ (В/Па). Значения дзета-потенциала рассчитывали с использованием классического уравнения Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = C_s \eta \sigma / \epsilon \epsilon_0 \quad (14),$$

где η - вязкость жидкости, σ - её проводимость, $\epsilon \epsilon_0$ - диэлектрическая проницаемость. Дзета-потенциалы карбоксилированных и магнитных частиц, покрытых SA, при разных значениях pH представлены на рис. 43.

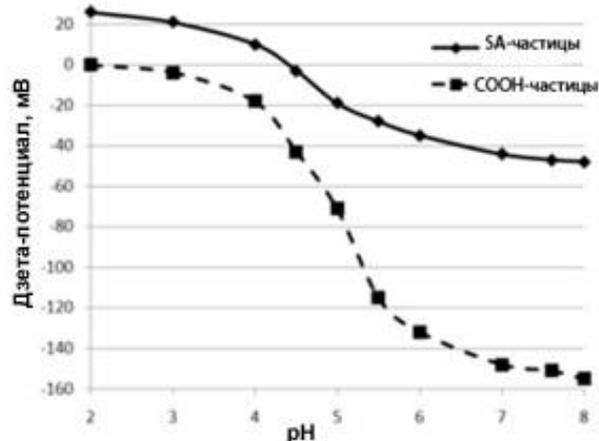


Рис. 43. Дзета-потенциалы карбоксилированных и SA-покрытых магнитных частиц в зависимости от pH.

Рис. 43 демонстрирует высокую кислотную природу карбоксилированных МЧ. Для частиц, покрытых SA, значение pI составило ~4,5. Это ниже, чем pI самого SA (pI ~ 6), вероятно, из-за оставшихся на поверхности частиц карбоксильных групп. При pH 7,4 частицы с SA-покрытием имеют дзета-потенциал около -50 мВ. Это значение использовалось в наших дальнейших оценках электростатической силы.

Дзета-потенциал поверхности плёнки из КМЦ измеряли с использованием техники вращающегося диска [218]. Плёнку изготавливали на круглом стекле диаметром 2 см. Диск прикрепляли к вращающейся головке и измеряли потенциал потока между двумя электродами Ag/AgCl, один из которых помещали близко к центру диска, а другой - на расстоянии. Измерения потенциала проводили в 1 мкМ растворе KCl при разных скоростях вращения диска. Для определения дзета-потенциалы SA- и карбоксилированных МЧ измеряли потенциал потока, генерируемого при движении буферного раствора через микроколону с частицами. Значения дзета-потенциала плёнки из КМЦ представлены на рис. 44. Основываясь на том, что зависимость ζ от логарифма концентрации соли для поверхности SiO₂ близка к линейной [219], ζ плёнки из КМЦ при концентрации соли 1 мМ и 10 мМ определяли экстраполяцией значений, полученных в разбавленных растворах. Значение ζ , использованное в дальнейших оценках, составило -100 мВ.

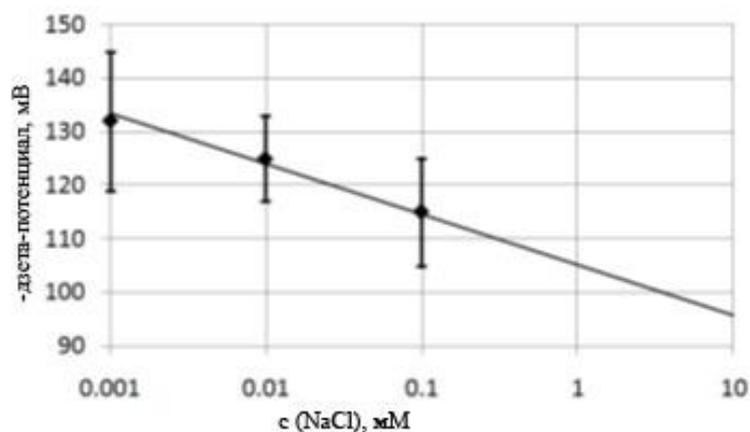


Рис. 44. Дзета-потенциал плёнки из КМЦ при различных концентрациях соли. Пределы погрешностей соответствуют 2,5 x CO.

Процедура обработки изображения

Количество МЧ в каждой зоне микрочипа рассчитывали с помощью программного обеспечения собственной разработки, подсчитывающего яркие пятна определённого размера на тёмном фоне [220]. Для настройки программного обеспечения предварительно обрабатывали тестовые изображения, в которых частицы подсчитывали вручную, а затем результаты сопоставляли. Средний сигнал и его среднеквадратичное отклонение рассчитывали для 15-20 зон. Используемое в экспериментах программное обеспечение является написанным на Java приложением, в котором использован алгоритм обнаружения видимых на экране пятен, а именно лапласиан алгоритма Гаусса [221]. Положения частиц определялись как локальные минимумы лапласиана сглаженной гауссовой светимости изображения $L(x, y, \sigma)$, которая может быть вычислена как свёртка

$$\nabla^2 L(x, y, \sigma) = \sum_{a=-N}^N \sum_{b=-N}^N f(x, y) LoG(x+a, y+b, \sigma)$$

светимости изображения $f(x, y)$ с лапласианом гауссова ядра

$$LoG(x, y, \sigma) = \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) \left(\frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right) \right) = \frac{1}{\pi\sigma^4} \left(\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} - 1 \right) \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right) \quad (15).$$

Масштабный параметр σ определяли экспериментально на основе общего размера частиц в пикселях, оптимальное значение составило $\sigma = 3$. Размер расчётной матрицы N принимали равным 6 - 9. Обычно обработка изображения размером 700×700 пикселей занимала 1-2 с (процессор Core i5-2400). Скриншот описанного приложения представлен на рис. 45.

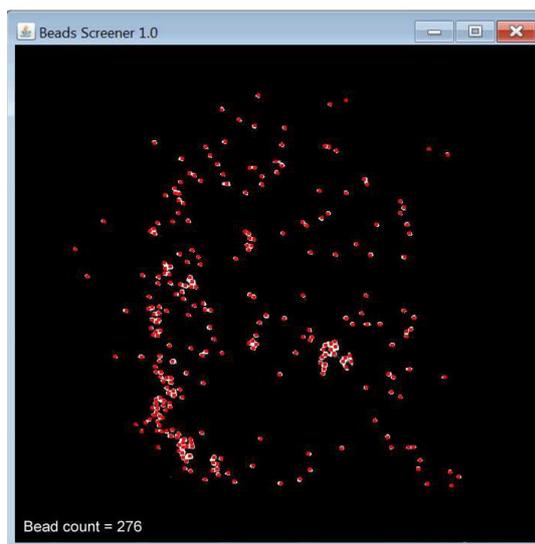


Рис. 45. Изображение магнитных частиц на поверхности микрочипа. Частицы, выявленные программным обеспечением, отмечены красными точками. Общее количество частиц показано в левом нижнем углу окна.

Титрование карбоксильных групп плёнки из КМЦ

Для титрования карбоксильных групп образец плёнки, содержащей ~ 3 мг сухой КМЦ, помещали в 0,1 М раствор HCl на 10 мин, промывали водой до постоянного значения pH, переносили в 0,5 мл 1 М раствора KCl и перемешивали до установления нового значения pH. Значение pH приводили к исходному значению титрованием 10,0 мМ раствором NaOH. Измерения адгезии МЧ к различным субстратам проводили методом «push-pull» и сканированием в сдвиговом потоке, как описано ранее.

Изготовление микрочипов на основе КМЦ

Плётку из КМЦ активировали в течение 20 мин в 0,4 М NHS, растворённом в 50 мМ MES, pH 6,0, содержащем 1 мас. % EDC, промывали водой, высушивали и немедленно использовали для получения микрочипов. Антитела против СТ осаждали на плётку электрораспылением диализованного 0,1 мас. % раствора моноклональных анти-СТ-IgG, содержащего 1 мас. трегалозы, как описано ранее. Субстраты с белково-сахарным покрытием выдерживали в течение 30 мин во влажной камере, а затем погружали на 1 ч в раствор, содержащий 0,5 г глицина, pH 9,0. Микрочипы промывали водой, 1%-ным раствором трегалозы и сушили. Для исследований стабильности на плётку из КМЦ вручную наносили 0,1 мкл 0,1%-ного раствора моноклональных анти-СТ-IgG, содержащего 1% трегалозы, причем все остальные процедуры были такими же, как описано выше. Для получения многокомпонентных микрочипов на основе КМЦ использовали принтер Xpress Lane (США) с пинами диаметром 140 мкм и 0,1%-ные растворы диализованных белков (Ova, белок А, антитела к СТ, SEA, TSST), содержащих 1% трегалозы. Для обеспечения бесконтактного способа печати, чтобы пин не повреждал плётку, аппаратное и программное обеспечение

регулировали так, чтобы наконечник пина останавливался на расстоянии 30-50 мкм от поверхности подложки. Для подачи раствора в бесконтактном режиме прикладывали импульс давления. После печати микрочипы обрабатывали, как описано выше.

Иммуноанализ бактериальных токсинов с использованием микрочипов на основе КМЦ

Раствор аналита (100 мкл) в PBS, содержащем 1% ПВП и 0,1% Твин-20 (буфер А), прокачивали через проточную ячейку в течение 3 мин. Затем 100 мкл раствора биотинилированных детектирующих антител (анти-СТ в концентрации 0,2 мкг/мл для однокомпонентного анализа или смесь анти-СТ, анти-SEA и анти-TSST в концентрации по 0,2 мкг/мл для мультиплексного анализа) в буфере А прокачивали через проточную ячейку в течение 2 мин. После этого под проточную ячейку помещали магнит и суспензию магнитных частиц, покрытых SA (0,001% в 1 mM фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 10 mM NaCl, 1% ПВП и 0.1% Твин-20), прокачивали через ячейку со скоростью 8 - 12 мкл/мин в течение 2 мин. Полученное изображение снимали камерой и рассчитывали количество МЧ, связавшихся в каждой зоне микрочипа.

Определение холерного токсина с использованием флуоресцентной метки

Микрочипы последовательно обрабатывали раствором, содержащим 20 мкг/мл СТ, затем биотинилированными моноклональными антителами анти-СТ-IgG (20 мкг / мл) и, наконец, Atto 655-SA (20 мкг/мл) в буфере А. Микрочипы после каждой стадии обработки промывали водой в течение 2 мин. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью чип-детектора VAF-1 (ММТех, Россия). Те же эксперименты без стадии связывания СТ проводили в качестве отрицательного контроля.

4.1.2. Исследование неспецифической адгезии магнитных частиц к различным субстратам

На первом этапе основные усилия были направлены на поиск материала подложки и методы обработки его поверхности, которые позволили бы производить микрочипы с минимальным фоном (плотность неспецифически связанных частиц) и максимальным отношением сигнал/шум. Технология «push-pull» обеспечивает самый простой способ характеристики взаимодействия поверхности с частицей, прижимая сначала магнитные частицы к поверхности подложки с помощью магнита, помещённого снизу, а затем удаляя несвязавшиеся частицы с поверхности с помощью другого магнита, подносимого сверху. Плотность частиц, оставшихся на поверхности, характеризует адгезию поверхности с частицами. Для исследования адгезионных свойств поверхности использовали два типа магнитных частиц: карбоксилированные и покрытые стрептавидином. Показано, что частицы, покрытые SA, обладают такими же адгезионными свойствами, как и частицы, покрытые другими слабокислыми или почти нейтральными белками, в том числе антителами. В работе были протестированы несколько типов поверхностей, в том числе и те, о которых сообщалось, что они успешно используются в анализах

с детекцией магнитными частицами в качестве меток. Полученные результаты суммированы в табл. 15.

Таблица 15. Неспецифическая адгезия МЧ к различным поверхностям.^{а, б}

Поверхность	Блокирование	SA-частицы	COOH-частицы
Полистирол	нет	6×10^3	2×10^3
	нет (без магнита) ^б	5×10^3	2×10^3
	БСА	1×10^3	2×10^2
	Сухое молоко	4×10^2	1×10^2
	Сухое молоко (без магнита) ^б	1×10^2	0
Стёкла, покрытые АПТЭС	Нет	$\geq 10^4$	$\geq 10^4$
	БСА	5×10^2	2×10^2
	Сухое молоко	2×10^2	2×10^2
Стёкла, покрытые альдегидом	Нет	$\geq 10^4$	$\geq 10^4$
	БСА	9×10^2	7×10^2
	Сухое молоко	2×10^2	1×10^2
Диализная мембрана	Нет	0	0
2%-ный агарозный гель	Нет	0	0

Примечания:

^а Значения соответствуют количеству оставшихся частиц на 1 мм^2 поверхности.

^б СО находились в пределах 20% от соответствующих значений.

^в В этом случае магнит не использовали. Частицы осаждались на поверхность под действием силы тяжести в течение 2 ч.

Как видно, покрытые белком частицы обладают более «липкими» свойствами по сравнению с карбоксилированными на всех исследованных поверхностях, кроме стёкол, покрытых АПТЭС и заблокированных молоком. Это может быть объяснено более выраженной гидрофобной природой покрытой белком поверхности частиц и её более низким отрицательным зарядом, что приводит к снижению электростатического отталкивания от поверхности подложки, если она также заряжена отрицательно. Несмотря на то, что поверхностно-активные вещества ПВП и Твин-20 присутствовали в среде во время измерения, частицы эффективно прилипали к чистой гидрофобной поверхности полистирола. Вероятно, это связано с динамической природой адсорбированного слоя поверхностно-активных веществ или белков, который может быть смещён в области контакта частицы с поверхностью магнитной силой. Это предположение подтверждается данными, представленными в табл. 16, в которой сравнивается плотность частиц, сорбированных на поверхности полистирола при приложении двух разных сил: низкой гравитационной ($\sim 2 \text{ фН}$) и гораздо большей силы, индуцированной магнитным полем ($\sim 2 \text{ пН}$) [4].

В то время как адгезия без блокирования белками одинакова, адгезия МЧ к поверхности, обработанной растворённым сухим молоком, сильно зависит от силы, прижимающей частицы к поверхности: магнитная сила, приложенная к частицам, приводит к более сильному их связыванию, предположительно, из-за выдавливания блокирующих молекул и значительного увеличения из-за вмятин площади контакта частицы с поверхностью. Блокирование полистирола и покрытие стекла БСА и сухим молоком снижает адгезию обоих типов частиц в 10-100 раз от исходного уровня, хотя значительная адгезия сохраняется. Эта «остаточная» адгезия может не влиять на «push-pull» - анализ, в котором каждая частица исследует только небольшую площадь поверхности микрочипа, и вероятность того, что частица упадёт непосредственно на сильно связывающий («горячий») участок, мала. Относительно низкий фон в этом случае всё же может обеспечить хорошее соотношение сигнал / шум [205]. Однако при сканировании в режиме сдвигового потока, когда частицы сканируют всю площадь поверхности в поисках конкретного участка, все «горячие» пятна будут в конечном итоге обнаружены и отмечены магнитными метками, что значительно увеличит фон. Таким образом, этот способ предъявляет более жесткие требования к адгезионным свойствам подложки. Наиболее распространенные субстраты, как показано ниже, не удовлетворяют условию низкой адгезии при сканировании даже после блокировки их поверхности.

На рис. 46 представлена зависимость количества сорбированных МЧ от сдвиговой скорости для различных поверхностей и разных способов блокировки.

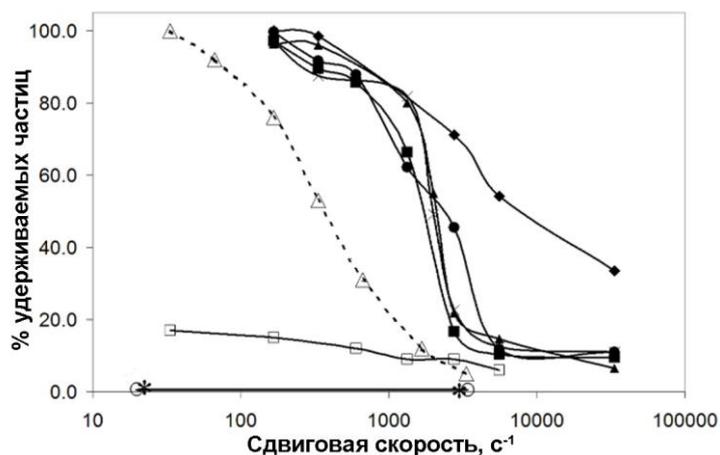


Рис. 46. Прочность специфических (пунктирная линия) и неспецифических (сплошные линии) связей между МЧ, меченных SA, и поверхностями, покрытыми: ◆ - АПТЭС; ■ – АПТЭС+ молоко; □ - КМЦ, 100 мМ NaCl; ○ - КМЦ, 10 мМ NaCl; * - диализная мембрана, 100 мМ NaCl; ● альдегид + молоко; ▲ - полистирол; × - полистирол + молоко; Δ – рассчитанная прочность специфического связывания антиген-антитело на диализной мембране. Концентрация СТ - 100 нг/мл. Для расчёта плотности связанных частиц использовали только активные зоны микрочипа.

Установлено, что адгезия частиц к полистиролу и стеклу, покрытому АПТЭС или альдегидом, не зависит от концентрации соли (10 или 100 мМ) и от способа блокировки: в большинстве случаев поверхности были очень "липкими" для МЧ, независимо от того, были ли они предварительно заблокированы или нет. Чтобы понять, насколько важен уровень неспецифической адгезии, нужно сравнить её с прочностью специфических связей антиген-антитело, которые сохраняют связанные в активных зонах частицы. Если неспецифические взаимодействия сильнее, сигнал будет неотличим от фона. На рис. 46 видно, что неспецифическая адгезия МЧ к перечисленным поверхностям существенно сильнее адгезии из-за специфических взаимодействий, и это означает, что данные субстраты непригодны для использования в анализах с применением магнитных частиц. Напротив, на мембране из регенерированной целлюлозы МЧ не удерживается при скоростях сдвига выше 20 с^{-1} , что подтверждает её низкие адгезионные свойства, уже отмеченные выше. Данные, представленные на рис. 46 и табл. 17 показывают, что целлюлозная мембрана и агарозный гель характеризуются чрезвычайно низкой неспецифической адгезией. Весьма вероятно, что низкая адгезия этих субстратов обусловлена энтропийным по природе стерическим отталкиванием свободных полисахаридных цепей и нитей на набухшей поверхности [221]. К сожалению, агароза не может использоваться в качестве субстрата для микрочипов в анализах с использованием детекции МЧ из-за её высокой проницаемости для белков, диффундирующих в глубину геля. Что касается целлюлозной плёнки, то её эффективность в качестве подложки микрочипов хорошо документирована [22, 25, 41]. Далее микрочипы, изготовленные на мембране из регенерированной целлюлозы будут использованы в качестве эталона, с которым будут сравниваться микрочипы на основе КМЦ. Надо отметить, что использование мембраны из необработанной целлюлозы в качестве подложки для микрочипов часто связано со многими техническими трудностями (она меняет свои размеры при сушке и увлажнении, и необходимы сложные и дорогостоящие процедуры для изготовления слоёв этих материалов на твердой подложке [221]). В этом контексте использование простой в изготовлении поверхности для компенсации гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых сил притяжения электростатическим отталкиванием между подложкой и частицами рассматривается как простая альтернатива мембране из целлюлозы.

4.1.3. Физико-химические характеристики плёнки из термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы

В одном из возможных вариантов реализации подхода, основанного на электростатическом отталкивании магнитных частиц от поверхности, предложена сшитая КМЦ-плёнка. КМЦ является легко доступным гидрофильным анионным полимером. Простым и эффективным методом сшивки плёнок, содержащих карбоновую кислоту, является их прокалывание при температуре 120-160 °С [222], приводящее к образованию сложноэфирных связей между спиртовыми и карбоксильными

группами. В работе этот метод термо-перекрёстной сшивки использовали для стабилизации плёнок из КМЦ на предметных стёклах. Поскольку плёнки из КМЦ не прилипают к поверхности стекла, к нему был добавлен дополнительный слой "клея". Как средство для усиления связывания плёнки из КМЦ с поверхностью стекла пробовали использовать адсорбированный слой полиэтиленimina (ПЭИ) и слой ковалентно-связанных полимерных молекул АПТЭС. В то время как использование покрытий из ПЭИ иногда приводило к отслоению плёнки, слой из АПТЭС после прокаливания обеспечивал прочное ковалентное связывание через силоксановые и амидные связи между поверхностью стекла и слоем КМЦ (рис. 47). Как правило, толщина полученной плёнки, измеренная с помощью интерферометра, составляла около 300 нм.

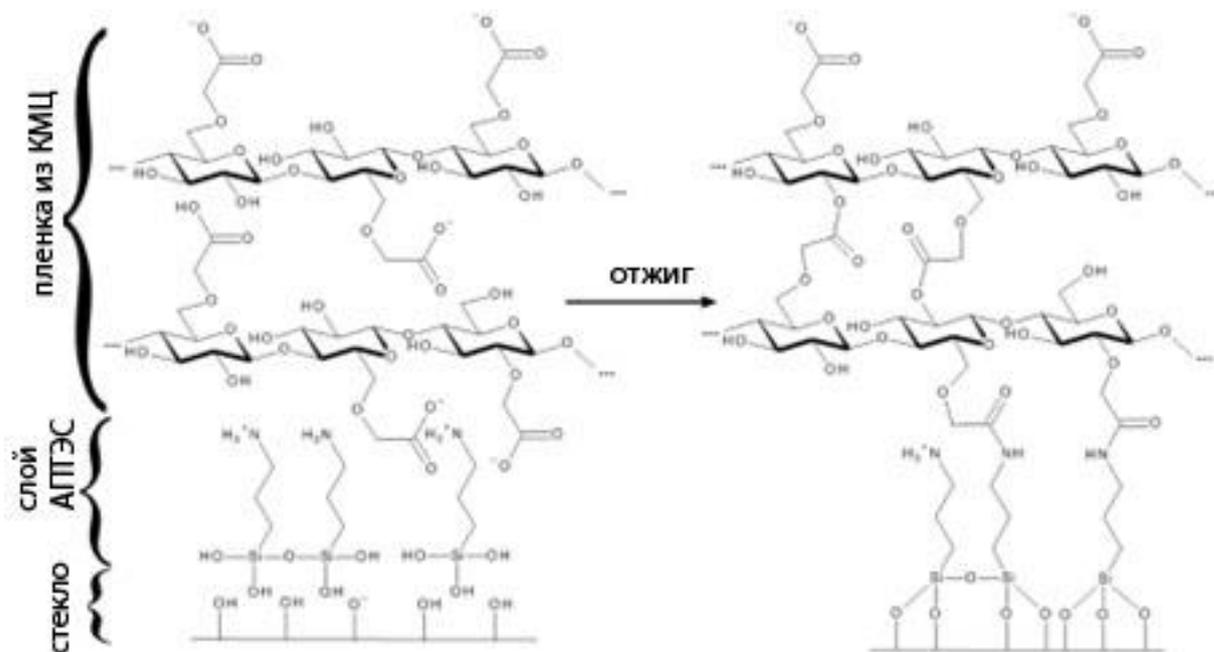


Рис. 47. Химическая схема сшивки плёнки из КМЦ и связывания плёнки с поверхностью стекла, покрытой АПТЭС.

На первом этапе исследовали зависимость набухания плёнки из КМЦ от температуры прокаливания (рис. 40). Для последующих экспериментов была выбрана температура 150 °С для сведения к минимуму времени реакции и, с другой стороны, для предотвращения разрушения полимера при более высоких температурах. Набухание прокалённых плёнок из КМЦ в зависимости от времени прокаливания представлено на рис. 48А. Плотность поперечных связей, оценённых по коэффициенту набухания с использованием теории Флори-Рейнера, нанесена на рис. 48Б в виде пунктирной линии. Плотность сшивок, независимо определённая по основному титрованию плёнок, даёт похожую зависимость от времени прокаливания (представлена сплошной линией на рис. 48Б. При этом процесс поперечной сшивки завершается при 150 °С за 1,5 ч. Независимо от того, какой метод был использован для оценки плотности поперечных связей,

показано, что из КМЦ получается довольно плотная полимерная сетка. Плотность сшивок важна как для изготовления микрочипов, так и для анализа с детекцией МЧ, поскольку она обеспечивает низкую проницаемость плёнки для молекул антител и аналита. Проницаемость сшитых плёнок характеризовали скоростью диффузии небольших молекул красителя внутри плёнки. Определено, что коэффициент диффузии фуксина в плёнке из КМЦ на 50% ниже, чем в диализной мембране (3,5 кДа), что свидетельствует о том, что сшитая КМЦ плотнее и должна быть менее проницаемой для белков, чем диализная мембрана.

Данные титрования, приведённые на рис. 48Б, были также использованы для оценки плотности свободных карбоксильных групп, оставшихся в сшитой КМЦ-плёнке. Принимая во внимание степень замещения в исходной пленке, равную 0,7 (согласно данным производителя), получается, что половина карбоксильных групп тратится на сшивку и $\sim 0,2$ свободных карбоксильных групп всё ещё остаются на единицу моносахарида. Это соответствует концентрации карбоксильных групп в плёнке ~ 1 М. Исследования с помощью АСМ показали, что сшитые КМЦ-плёнки обладают очень гладкой поверхностью (рис. 49). Уже отмечалось, что гладкость поверхности микрочипа чрезвычайно важна при детекции аналитов сканированием магнитных частиц, так как прочность как специфических, так и неспецифических взаимодействий поверхности с частицей сильно изменяется с шероховатостью [223]. Шероховатость поверхности КМЦ в масштабе, сравнимом с размером частицы $0,5 \text{ мкм}^2$, характеризовалась значением $0,8 \pm 0,2$ нм, что существенно ниже шероховатости диализных мембран, равной $6,5 \pm 1,0$ нм [223].

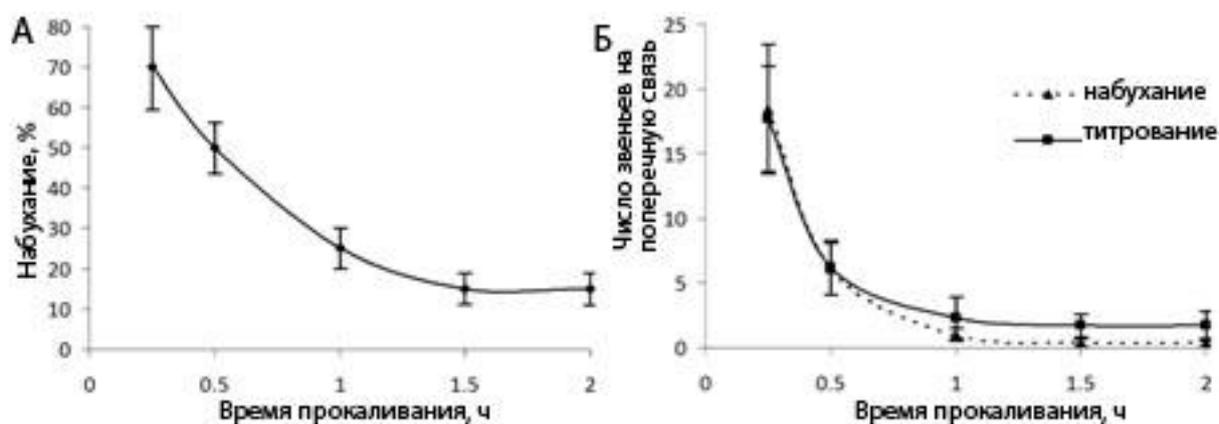


Рис. 48. (А) Набухание плёнок КМЦ в зависимости от времени прокаливания. (Б) Плотность сшивок в КМЦ, определяемая по набуханию плёнки и по данным титрования, в зависимости от времени прокаливания. Температура прокаливания - 150 °С. Пределы погрешностей соответствуют 2.5 x CO.

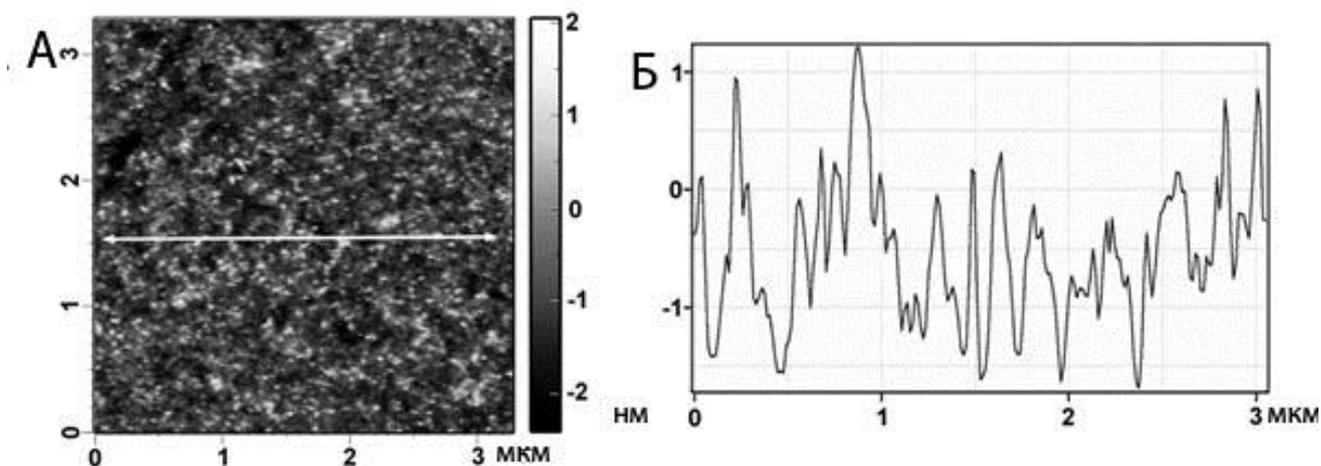


Рис. 49. (А) Изображение поверхности плёнки из КМЦ, полученное методом АСМ. Белая стрелка показывает положение поперечного сечения, представленного на панели Б. (Б) Профиль поверхности КМЦ на поперечном сечении, указанном на панели А.

Оценка электростатических взаимодействий между КМЦ-плёнкой и магнитными частицами

Измеренная методом «push-pull» адгезия карбоксилированных и частиц, покрытых SA, имеющих отрицательно заряженную поверхность при нейтральном значении pH, к плёнке из КМЦ показывает сильную зависимость от ионной силы (рис. 50А). В то время как в буферном растворе с низкой концентрацией соли (<20 мМ NaCl) МЧ не прилипали к плёнке, при более высоких концентрациях соли появлялся фон, который был значительно выше для SA-МЧ, чем для карбоксилированных МЧ. В режиме сканирования при сдвиговых скоростях выше 20 с^{-1} , ни одна частица не удерживалась на субстрате из КМЦ в 10 мМ растворе (рис. 46). Для той же плёнки при повышении концентрации соли до 100 мМ наблюдалась более сильная неспецифическая адгезия. В то время как основная часть частиц ($\sim 85\%$) удалялась с поверхности при малых скоростях сдвига ($<50 \text{ с}^{-1}$), те, которые были в состоянии преодолеть электростатическое отталкивание, сильно сцеплялись с поверхностью и не могли быть удалены даже при скорости сдвига 8000 с^{-1} . Эти данные говорят о том, что электростатическое отталкивание между частицами и поверхностью плёнки значительно затрудняет адгезию МЧ к поверхности, уравнивая гидрофобные силы. При высокой ионной силе электростатические взаимодействия подавляются, что приводит к усилению неспецифической адгезии.

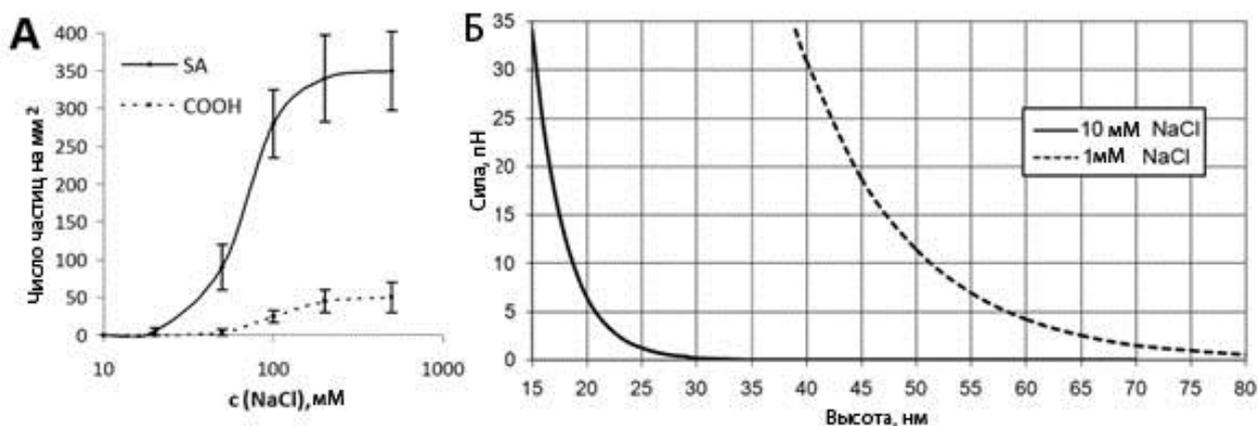


Рис. 50. А) Адгезия магнитных частиц к плёнке из КМЦ, измеренная методом «push-pull» в зависимости от концентрации NaCl. Б) Электростатическая сила отталкивания между магнитной частицей диаметром 1 мкм и плёнкой из КМЦ в 1 мМ и в 10 мМ растворе соли. Пределы погрешностей соответствуют 2.5 x CO.

Для сравнения магнитных и электростатических сил, участвующих во взаимодействиях поверхности с частицей, была вычислена сила электростатического отталкивания как функция расстояния между частицей и плёнкой. Согласно приближению Дерягина, сила, действующая на сферу с радиусом R на расстоянии h от плоской поверхности, равна [224, 225]:

$$F(h) = 2\pi RW(h) \quad (5),$$

где W(h) - энергия взаимодействия на единицу площади между двумя плоскими поверхностями.

Согласно [261], значения W(h) в теории ДЛФО для асимметричных систем оцениваются как:

$$W(h) = (64n_0kT\gamma(1)\gamma(2)/\kappa) e^{-\kappa h} \quad (6),$$

где n_0 - концентрация электролита ($n_0 = 6 \times 10^{24} \text{ l} / \text{m}^3$ для 10 мМ раствора NaCl), κ - обратная длина дебаевского скрининга ($\kappa^{-1} = 3 \text{ нм}$ для 10 мМ раствора NaCl) и $\gamma(i) = \tanh(Ze\phi_0(i) / 4kT)$ - приведённые потенциалы.

Чтобы вычислить силу, нужно знать значения поверхностного потенциала ϕ_0 для обеих поверхностей. Хотя значения ϕ_0 едва ли могут быть непосредственно измерены, в качестве близких оценок поверхностного потенциала могут быть использованы значения дзета-потенциала [226]. Как показано в экспериментальной части, оценка дзета-потенциала плёнки из КМЦ при 10 мМ NaCl даёт значение -100 мВ. Найти значения дзета-потенциала МЧ, покрытых SA, в литературе не удалось, поэтому оно было измерено. Используя полученное при pH 7,4 значение -50 мВ и потенциал поверхности КМЦ -100 мВ, была рассчитана зависимость электростатического отталкивания в зависимости от расстояния между поверхностью микрочипа и частицей. Как следует из рис. 50Б, электростатическое отталкивание уравнивается магнитной силой ~ 2-3 pN, притягивающей частицу к поверхности в 10 мМ растворе соли с расстояния 23 нм. Учитывая

размер молекулы IgG (~15 нм) и размер молекулы аналита, получается, что электростатическое отталкивание позволяет образовать специфические связи, но препятствует образованию короткодействующих неспецифических Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, как будет обсуждено ниже.

4.1.4. Мультиплексный иммуноанализ с использованием микрочипов на основе плёнки из карбоксиметилцеллюлозы

Изготовление микрочипов на плёнке из КМЦ потребовало изменить стандартный способ дезактивации эфирных групп, оставшихся после иммобилизации биомолекул. Обычно используемые тушители, такие как этаноламин или другие амины, резко снижают общий заряд плёнки из КМЦ. Снижение плотности заряда достигало 80% (по базовому титрованию NHS/EDC-активированной и заблокированной этаноламином КМЦ-плёнки), что привело к значительному росту неспецифической адгезии МЧ даже при низкой ионной силе. Неспецифическая адгезия была устранена добавлением глицина, сохраняющего отрицательный заряд после взаимодействия с активным эфиром в отличие от нейтрального этаноламина. Для демонстрации эффективности микрочипов на основе КМЦ в иммунологическом анализе, использовали пару моноклональных антител против холерного токсина. Анализ включал последовательное связывание СТ и биотинилированных анти-СТ-антител на микрочипе и определение связанного токсина с помощью сканирования поверхности магнитными частицами, покрытыми SA в сдвиговом потоке. Показано, что при сканировании в буфере с концентрацией соли ниже 1 мМ, сигнала не было видно ни при какой концентрации СТ. Вероятно, при низкой ионной силе электростатическое отталкивание является слишком сильным и вынуждает магнитные частицы скользить по поверхности на слишком большом для формирования комплекса антиген-антитело расстоянии даже в присутствии магнитной силы, притягивающей частицы к поверхности. Согласно приведенным выше оценкам теории ДЛФО, в 1 мМ соли сила притяжения частицы в 3 пН будет находиться на расстоянии 65 нм от поверхности (см. рис. 50Б), что слишком далеко для образования каких-либо межмолекулярных связей. При концентрации соли в диапазоне 5 - 50 мМ появлялся довольно интенсивный сигнал, и его уровень не зависел от концентрации соли, как следует из данных рис. 51А.

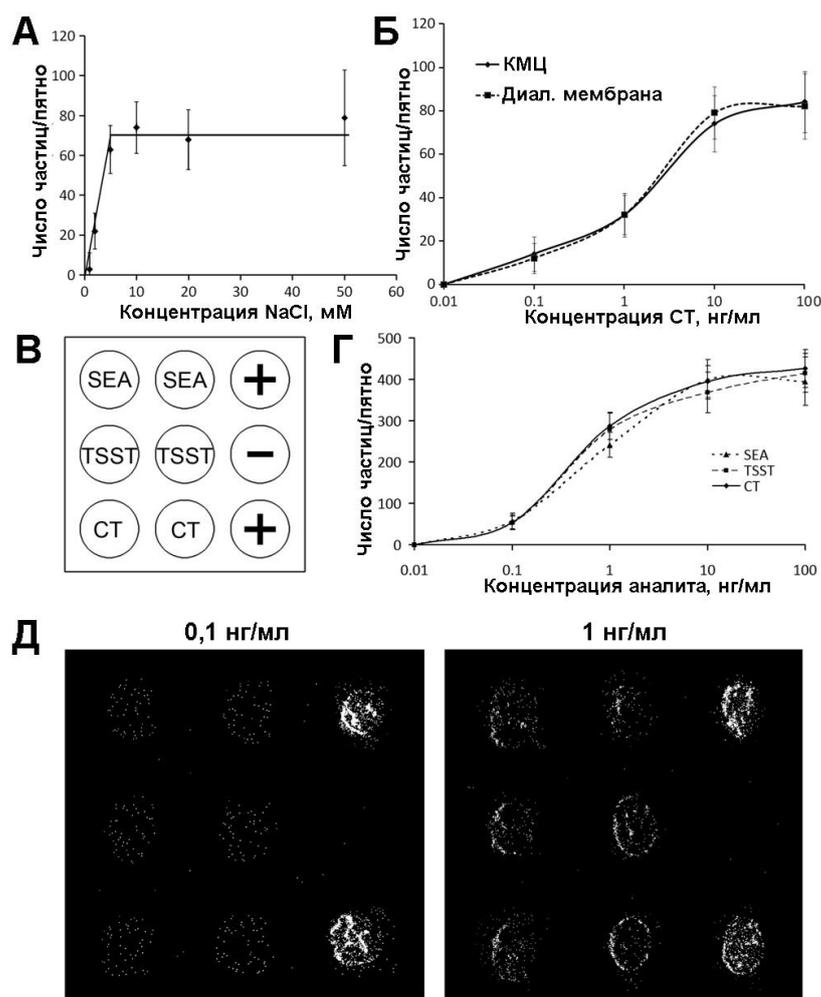


Рис. 51. Иммуноанализ СТ на микрочипах. (А) Зависимость сигнала на пленке из КМЦ от концентрации NaCl. Концентрация СТ - 10 нг/мл. Сканирование МЧ проводили в 0,1 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, 1% ПВП, 0,1% Твин-20 и NaCl. (Б) Зависимость сигнала на диализной мембране и на плёнке из КМЦ от концентрации СТ. Концентрация NaCl - 10 мМ. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$. (В) Схема многокомпонентного микрочипа. (+) - положительный контроль (белок А), (-) - отрицательный контроль (Ova). (Г) Зависимость сигнала от концентрации токсинов. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$. (Д) Результаты мультиплексного иммуноанализа СТ, SEA и TSST. Концентрации токсинов указаны в верхней части рисунка. В положительном контроле наблюдали 405 ± 71 частиц/пятно, в отрицательном - 2 ± 2 частиц/пятно. Расстояние между центрами зон составляет 0,5 мм.

Неспецифическая адгезия частиц не проявлялась при концентрации NaCl ниже 20 мМ. Таким образом, концентрация соли в диапазоне 5-20 мМ является оптимальной для иммуноанализа на субстрате из КМЦ. Изображения микрочипов со связанными частицами, полученных при разных концентрациях СТ, показаны на рис. 52. Рассчитанный предел обнаружения СТ составил $\sim 0,1$ нг/мл.

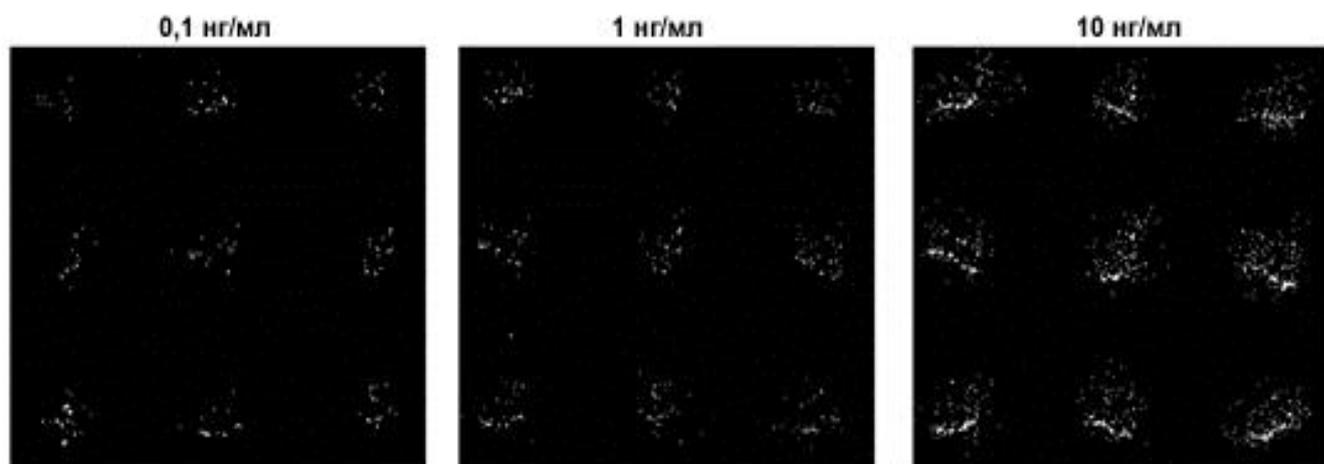


Рис. 52. Изображения микрочипов с анти-СТ, изготовленных на плёнке из КМЦ, после обработки различными концентрациями СТ и детекции магнитными метками. Расстояние между центрами зон составляет 0,25 мм. Концентрации СТ указаны в верхней части рисунка.

Для сравнения эффективности микрочипов, изготовленных на плёнке из КМЦ и мембране из целлюлозы, на рис. 51Б представлены градуировочные графики для расчета ПрО СТ [41]. Значения сигналов, полученные с использованием того же набора антител, на плёнке из КМЦ и на диализной мембране были неразличимы, и соответствующие ПрО совпадали; однако сигнал на диализной мембране не зависел от ионной силы в значительно более широком диапазоне концентраций NaCl, 5 - 150 мМ. Принимая во внимание значительно меньшую плотность заряда диализной мембраны (~10 мМ [43] против 1 М в плёнке из КМЦ), можно предположить, что не электростатическое, а энтропийное отталкивание цепей целлюлозы ответственны за подавление фонового сигнала на диализной мембране.

Чтобы продемонстрировать работу микрочипов на основе КМЦ в мультиплексном анализе, были изготовлены пятикомпонентные микрочипы для одновременного обнаружения трёх бактериальных токсинов: СТ и двух токсинов золотистого стафилококка, SEA и TSST. В этом случае для изготовления микрочипов вместо электрораспыления использовали бесконтактную печать. Каждый микрочип состоял из зон антител, специфичных для каждого аналита (в двух повторах), двух зон белка А, выбранного в качестве положительного контроля, и одной зоны Ова, выбранного в качестве отрицательного контроля (рис. 51В). Величина предела обнаружения СТ в этом случае совпала с величиной, полученной на микрочипах, изготовленных методом электрораспыления. Такое же значение, ~0,1 нг / мл, было получено для двух других токсинов, SEA и TSST. Концентрационные зависимости сигналов для этих аналитов показаны на рис. 51Г. Примеры изображений, полученных в мультиплексном анализе всех трёх аналитов, представлены

на рис. 51Д. Как показано на рис. 53, при концентрациях до 1 мкг / мл для каждого токсина ложных положительных сигналов не наблюдалось.

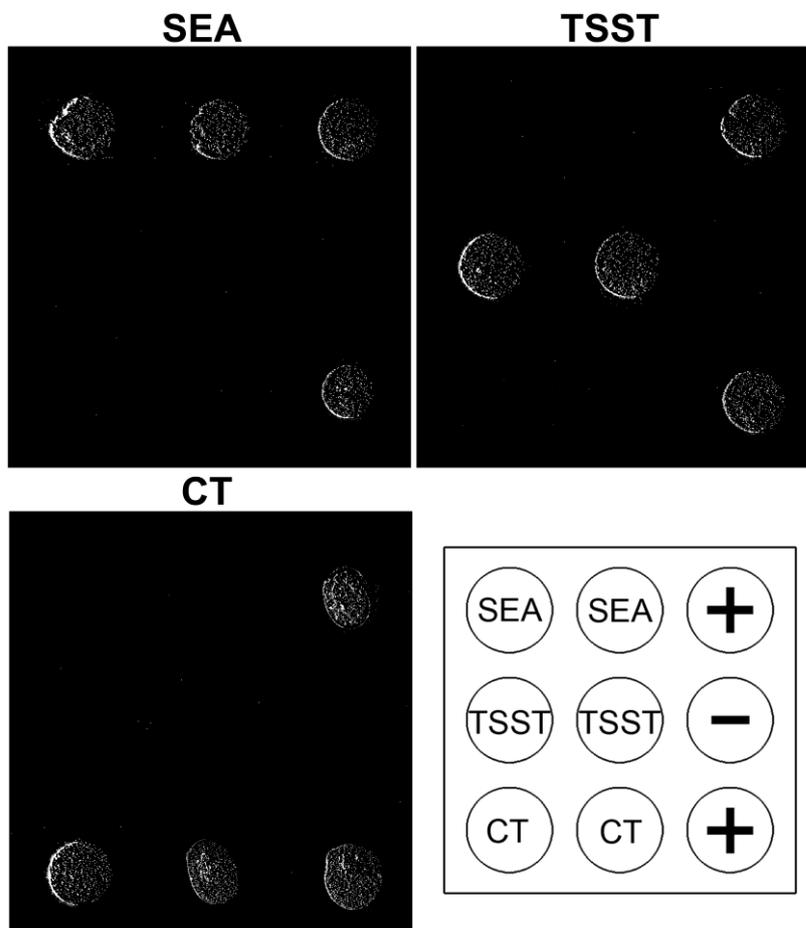


Рис. 53. Иллюстрация специфичности иммуноанализа бактериальных токсинов на микрочипах, изготовленных на пленке из КМЦ. В каждом эксперименте использовали один токсин в концентрации 1 мкг/мл. Дизайн микрочипа приведен в правом нижнем углу. Знак (+) - положительный контроль (белок А), знак (-) - отрицательный контроль (Ova); антитела, специфичные к указанным токсинам, нанесены в двух повторах. Расстояние между центрами зон - 0,5 м SEA и TSST. Концентрации токсинов указаны в верхней части рисунка.

Надо отметить, что микрочипы на основе КМЦ-плёнки демонстрируют отличную стабильность при хранении. Чтобы облегчить оценку качества микрочипов, иммуноанализ выполняли с помощью флуоресцентно-меченного вторичного антитела. Микрочипы с иммобилизованным на поверхности анти-СТ-IgG выдерживали в различных условиях (на воздухе, в атмосфере азота при -20 °С, +4 °С и комнатной температуре), и ни в одном из образцов не было обнаружено потери сигнала даже после года хранения (рис. 54). Ввиду простого способа

изготовления, применение КМЦ-микрочипов кажется весьма перспективным для иммуноанализа биомакромолекул с детекцией сигнала магнитными метками.

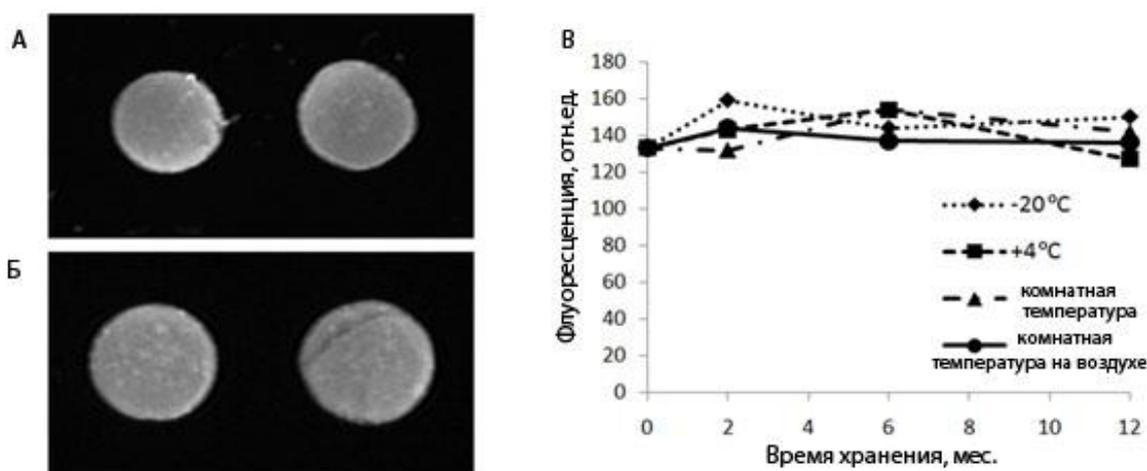


Рис. 54. Иммунофлуоресцентный анализ СТ на микрочипах на основе плёнки из КМЦ (А) свежеприготовленные микрочипы; (Б) микрочипы, хранившиеся на воздухе при комнатной температуре в течение одного года. (В) Зависимость сигнала в иммунофлуоресцентном анализе от времени хранения микрочипов в различных условиях. С₀ сигнала при любом способе хранения составлял 11-14% (пределы погрешностей опущены для ясности просмотра).

4.1.5. Выводы к разделу 4.1.

В результате проведенных исследований разработан новый тип твердой подложки для изготовления микрочипов - термосшитая плёнка из карбоксиметилцеллюлозы. Её основной особенностью является низкая адгезия магнитных частиц, покрытых слабокислыми белками. Применение таких подложек весьма перспективно для иммуноанализа белков с детекцией сигнала магнитными метками, в том числе в автоматических анализаторах. Микрочипы, изготовленные на такой плёнке, демонстрируют низкий фон и высокую чувствительность при использовании в иммуноанализе, а также стабильность при длительном хранении.

4.2. Повышение эффективности иммуноанализа за счет расщепляемой блокировки поверхности микрочипов

Ключевыми проблемами, с которыми приходится сталкиваться при разработке микрочипов для иммуноанализа, являются диффузионные ограничения и неспецифическое связывание аналита. В настоящей работе предложено решение, направленное как на ускорение массопереноса, так и на кардинальное снижение фона в анализе на микрочипах. Решение состоит в формировании на поверхности гидрофобного химически расщепляемого покрытия путем блокирования

функциональных групп, непрореагировавших после ковалентной иммобилизации белков, особым блокирующим агентом – амином с перфторацильной группой, присоединенной через дисульфидный линкер. Полученная поверхность обладает повышенной гидрофобностью, поэтому на нем не остаётся неперемешиваемого слоя жидкости, что существенно повышает эффективность массопереноса анализируемого вещества к активной зоне микрочипа. Перед детекцией сигнала дисульфидные связи химически расщепляются, а перфторалкильные цепи удаляются с поверхности микрочипа вместе со неспецифически адсорбированными белками, при этом фоновый сигнал значительно понижается. Используя флуоресцентную детекцию, показано 30-кратное увеличение отношения сигнал / фон по сравнению со стеклянной подложкой, модифицированной эпокси-группами. Комбинация этого метода с детекцией магнитными метками приводит к простому и чувствительному иммуноанализу на холерный токсин с ПрО 1 фМ при времени связывания аналита 1 час. Эффективный массообмен обеспечивает также высокочувствительное обнаружение целых вирусных частиц, несмотря на их низкий коэффициент диффузии. Достигнутый ПрО вируса осповакцины составил 10^4 частиц в 1 мл образца. Наконец, впервые проведено одновременное обнаружение целых вирусов и белкового биомаркера в одном анализе. Таким образом, разработанная методика может быть использована для мультиплексного обнаружения следовых количеств патогенов различной природы.

Хотя технология, основанная на применении микрочипов давно известна, и постоянно прилагаются значительные усилия для ее дальнейшего усовершенствования, их рутинное использование в диагностических или скрининговых приложениях сильно ограничено из-за ряда нерешённых проблем [227]. В первую очередь, это касается улучшения массопереноса аналита на поверхность микрочипа и увеличения отношения сигнал / шум за счет уменьшения фона. За последние десятилетия было предпринято множество попыток преодолеть фундаментальное ограничение, вызванное низкой диффузией аналита из образца к иммобилизованным на поверхности сенсорным молекулам. Одним из эффективных способов решения этой проблемы является электрофоретическое концентрирование, которое позволяет наиболее полно собрать молекулы аналита в активной зоне в течение 1–3 мин [22, 43, 84]. Этот подход, однако, ограничен жёстким требованием низкой проводимости образца. Для улучшения массопереноса были предложены другие технологические разработки, в том числе, различные типы перемешивания, но их эффективность оказалась невысокой из-за неперемешиваемого слоя жидкости, примыкающего к поверхности микрочипа [228, 229]. Такие ограничения особенно важны при обнаружении частиц большого размера, например, целых вирусов, имеющих низкие коэффициенты диффузии. Чтобы минимизировать расстояние между анализируемым веществом и поверхностью было предложено улавливать вирусы не на плоской поверхности, а на пористых фильтрах во время иммунофильтрации [230], иммунохроматографии [231] или на наночастицах [232, 233].

Сообщалось об ультравысокой чувствительности таких анализов, достигающих ~ 100 вирусов/мл [233]. Однако для обнаружения вирусов планарные микрочипы имеют значительные преимущества, т.к. в этом случае вирусы могут быть объединены с другими биомаркерами в технически простом, дешевом, но высокочувствительном анализе. Для ускорения массопереноса в случае плоской поверхности чрезвычайно эффективным оказался циклический процесс “стекания-восполнения” раствора при вращении сосуда с микрочипом [234], но если только он имеет гидрофобную поверхность.

Неспецифическое связывание - еще одна хорошо известная проблема гетерофазных анализов. Обычно ее решают, понижая уровень адгезии поверхности за счёт дополнительного покрытия привитым гидрофильным, таким как ПЭГ [235], или перфторированным полимером [236, 237]. Несмотря на низкую степень адсорбции белков на перфторированной поверхности [240], на ней всё равно остаётся часть вещества [241]. Это, очевидно, верно для всех таких подходов: фон, вызванный неспецифическим связыванием белков, уменьшается, но не устраняется полностью. Когда выбор подложки predetermined, низкая адгезия может быть обеспечена за счет покрытия поверхности микрочипа специальным блокирующим агентом [238, 239]. В данной части работы для решения проблем как массопереноса, так и снижения фона нами был предложен новый блокирующий агент, который образует на поверхности микрочипов химически расщепляемое покрытие. В литературе описаны ферментативно расщепляемые покрытия для контроля свойств поверхности наночастиц, используемых для воздействия на опухоль [242]. Известно, что фотохимическое расщепление покрытия из ПЭГ на самоорганизующемся монослое способно контролировать адгезию клеток [243]. Показано, что после ковалентной иммобилизации ДНК или белков с использованием расщепляемых линкеров, молекулы можно «освободить» УФ-облучением [244], действием фермента [245], основания [246] или кислоты [247]. Но наиболее распространёнными для подобных целей являются дисульфидные линкеры, которые легко расщепятся под действием восстановителя. Их использовали для иммобилизации пептидов и белков на плоских субстратах [248, 249], наночастицах [250], гидрогелях [251] или для высвобождения флуорофоров с поверхности в иммуноанализе [252]. Однако, насколько нам известно, расщепляемые линкеры никогда ранее не использовались для блокирования поверхности микрочипов.

4.2.1. Материалы и методы исследования

Для модификации антител красителем Cy5, 50 мкл раствора анти-СТ с концентрацией 1 мг / мл в 50 мМ карбонатном буфере, pH 8,5, смешивали с 5 мкл 3%-ного эфира Cy5 NHS в ДМСО и инкубировали в течение ночи при +4 °С с последующим диализом против воды.

Вирус осповакцины выделяли из живой вакцины (НПО «Микроген», Россия). Сухую вакцину растворяли в воде и центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. Вирусы осаждали из супернатанта ультрацентрифугированием при 30000 g в течение 1 ч, ресуспендировали в воде, наносили на свежесколотую поверхность слюды и сушили в токе азота. Для сканирования использовали атомно-силовой микроскоп Smart SPMТМ-1000 (АИСТ-НТ, Россия) в контактном режиме с резонансной частотой 100-150 кГц. Результат типичного сканирования показан на рис. 55 (А). Среднее количество вирусных частиц на единицу площади рассчитывали по результатам трех сканирований участка 20×20 мкм² и по этим данным оценивали концентрацию вируса в образце. Наблюдаемые размеры отдельного вируса составляли $450 \times 500 \times 100$ нм (рис. 55 (Б)). Согласно [253], сухой вирус осповакцины имеет размер $437 \times 527 \times 83,5$ нм, что хорошо согласуется с полученными значениями.

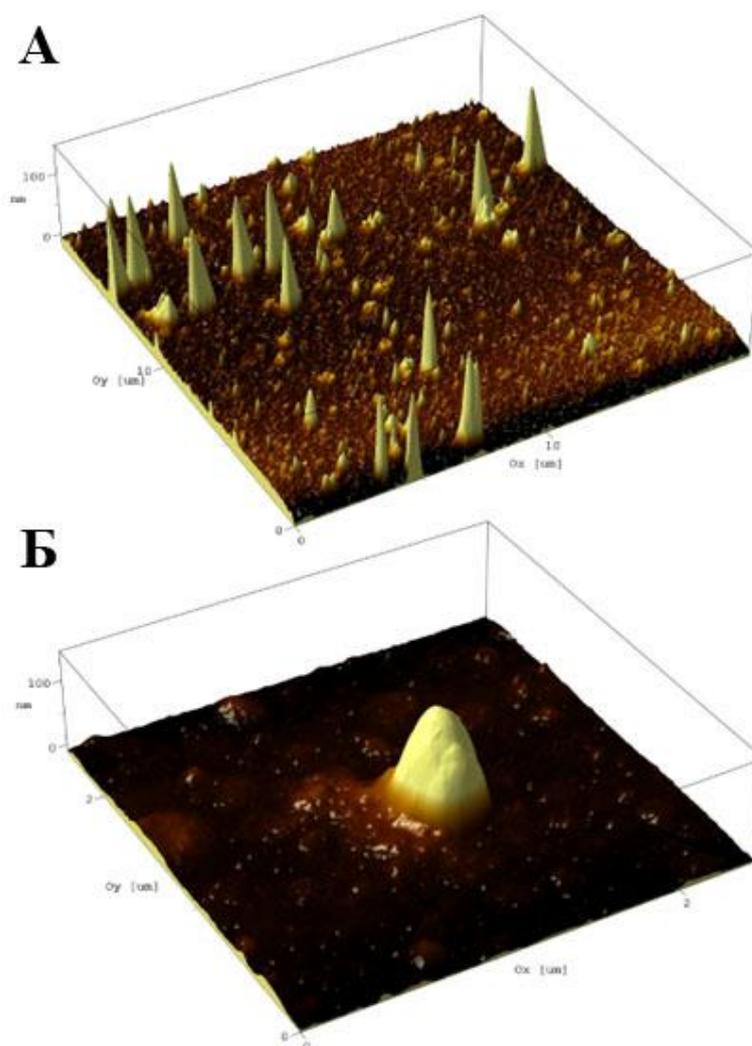


Рис. 55. Количественная оценка и геометрические размеры вируса коровьей оспы по данным АСМ. (А) Размер изображения 20×20 мкм². (Б) Размер изображения 2×2 мкм²

Полноразмерный рекомбинантный антиген вируса осповакцины A27L использовали в качестве иммуногена для получения моноклональных антител по общей гибридомной технологии [254]. Антитела были любезно предоставлены к.б.н. М.М. Зариповым (ИТЭБ РАН).

Синтез блокирующего агента

Гидрохлорид диметилового эфира цистина (205 мг, 0,6 ммоль) растворяли в 5 мл воды и доводили рН до 12. Смесь экстрагировали эфиром, концентрировали в вакууме и полученное свободное основание диметилового эфира цистина сушили в течение ночи в эксикаторе. Перфторацилирование проводили с помощью 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI), как описано в работе [255]. Перфторнонановую кислоту (92 мг, 0,2 ммоль) растворяли в 1 мл безводного хлороформа и приливали к 1мл раствора CDI (40 мг, 0,24 ммоль) в хлороформе. Полученную суспензию добавляли к диметиловому эфиру цистина в 2 мл хлороформа и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Для удаления избытка цистина и имидазола реакционную смесь экстрагировали 3 раза 10 мл 50 мМ HCl. Органическую фазу концентрировали под вакуумом, добавляли 5 мл диоксана и 2 мл 100 мМ HCl и кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч. Смесь концентрировали в вакууме, повторно растворяли в 5 мл 10 мМ HEPES и доводили рН до 7,0. Раствор, содержащий ~ 30 мМ продукта, использовали без дополнительной очистки для блокирования микрочипов.

Изготовление микрочипов

Диализную мембрану обрабатывали 1%-ным раствором цианурхлорида в сухом толуоле в течение 1 мин, промывали толуолом, сушили на воздухе и сразу использовали для осаждения белка. Микрочипы изготавливали электрораспылением растворов антител с концентрацией 1 мг/мл, содержащих трегалозу (1:10), на активированную мембрану или предметное эпоксилированное стекло, как описано ранее. Для иммунофлуоресцентного анализа в качестве маски использовали пленку из поливинилхлорида с перфорацией 500 мкм, расположенной на расстоянии 3 мм, а для анализов с детекцией МЧ - полиэфирную сетку с отверстиями 200 мкм. Микрочипы инкубировали во влажной атмосфере в течение 30 мин и блокировали 30 мМ раствором фторсодержащего амина, рН 7,0, в течение 1 ч при комнатной температуре. Для контрольных экспериментов использовали 100 мМ этаноламин, рН 7,5. Для флуоресцентного анализа мембрану разрезали на кусочки размером $10 \times 5 \text{ мм}^2$, для анализов с детекцией магнитными метками – $5 \times 5 \text{ мм}^2$. Стекла с эпоксилированным покрытием изготавливали обработкой предметных стекол, предварительно подвергнутых плазменной очистке, 1 мас. %-ным раствором (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана и 1 об. % триэтаноламина в этаноле в течение 1 ч с последующей промывкой этанолом и прокаливанием в течение 2 ч при 120 °С.

Измерения краевого угла

На исследуемые поверхности наносили капли воды объемом 1 мкл. Примеры полученных изображений показаны на рис. 56. Для оценки краевого угла смачивания использовали не менее 3-х повторов. Угол смачивания в фоновой зоне, где белок не был иммобилизован и которая, как ожидается, плотно покрыта гидрофобными фторированными группами, составил $89 \pm 15^\circ$ (рис. 56А). Поскольку микрочип предназначен для использования в анализе сложных биологических образцов, было изучено влияние адсорбции белков на угол смачивания: после инкубации в течение ночи в сыворотке крови человека он снизился до $77 \pm 17^\circ$ (рис. 56Б). Краевой угол в активных зонах, содержащих иммобилизованные антитела вместе с фторсодержащим покрытием, составил $70 \pm 15^\circ$ (рис. 56). Он оказался ниже, чем в фоновой зоне, так как некоторая часть поверхности занята менее гидрофобным белком. С такой поверхности наблюдалось полное стекание водных растворов. После обработки ТСЕР контактный угол уменьшился как в фоновой, так и в рабочей зоне микрочипа. Соответствующие значения ($14 \pm 5^\circ$, рис. 56Г и $16 \pm 5^\circ$, рис. 56Д) были такими же, как для нативной мембраны ($16 \pm 7^\circ$, рис. 56Е), что указывает на полное удаление фторсодержащего покрытия.

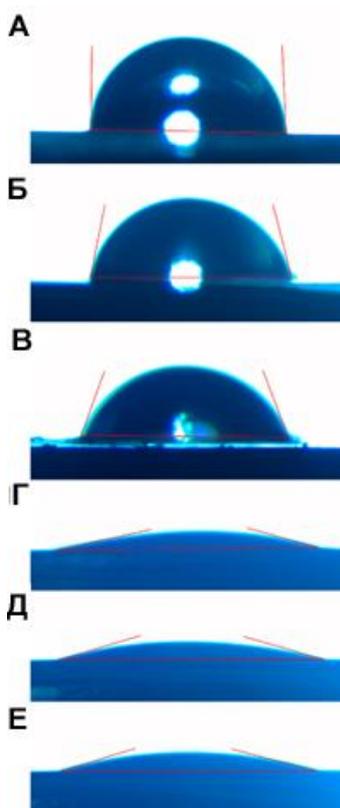


Рис. 56. Примеры изображений капли воды на различных поверхностях: (А) фоновая зона микрочипа со фторированным покрытием; (Б) фоновая зона после 12 ч инкубации с сывороткой человека; (В) рабочая зона фторсодержащего микрочипа; (Г) фоновая зона и (Д) рабочая зона фторсодержащего микрочипа после обработки ТСЕР; (Е) нативная мембрана из целлюлозы.

Исследования гидрофобности поверхности проводили также путем измерения силы адгезии между поверхностью и гидрофобным кантилевером в воде, как описано в [256]. Контактные кантилеверы frC11 (НИИФП, Россия) с резонансной частотой 15-20 кГц гидрофобизировали в парах триметилхлорсилана в течение 1 ч. Перед экспериментом образец и кантилевер выдерживали в воде в течение 15 мин. Для получения сканов исследуемых поверхностей размером 1×1 мкм² использовали контактный режим. Измерение силы проводили в 100 положениях для каждого образца. Силу адгезии рассчитывали по величине отклонения кантилевера, используя коэффициент жёсткости.

Проведение иммуноанализа с флуоресцентной детекцией

Микрочипы инкубировали 1 ч в растворах с заданными концентрациями СТ или IL-1 β в PBS с Твин-20 (PBS-T), содержащем 1% обезжиренного сухого молока, промывали 3×5 мин PBS-T, затем инкубировали 1 ч в растворе 5 мкг / мл меченного Cy5 антитела против СТ или биотинилированного антитела против IL-1 β в PBS-T с 1% сухого молока и промывали 3×5 мин PBS-T. Для анализа IL-1 β микрочипы инкубировали в растворе 10 мкг / мл Cy5-меченного стрептавидина в PBS-T, содержащем 1% сухого молока, с последующей промывкой 3×5 мин PBS-T. Фторсодержащие микрочипы промывали 100 мМ ТСЕР, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0 в течение 5 мин с последующей промывкой 2×5 мин PBS-T. Изображения рабочих зон микрочипа получали с помощью имидж-сканера GE Healthcare Typhoon FLA 9500. Флуоресцентные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ путем расчета средней яркости и ее вариации в не менее чем в 3-х рабочих зонах микрочипа и 3-х областях вне этих зон.

Анализ с детекцией магнитными частицами

Кусочек микрочипа помещали в полипропиленовую пробирку (1,5 мл), содержащую 750 мкл раствора образца с заданными концентрациями СТ или вируса коровьей оспы в PBS-T. Мембрана прикреплялась к стенке гидрофильной стороной и не двигалась при вращении пробирки со скоростью до 20 об/мин. Затем микрочип извлекали, промывали водой, инкубировали в 100 мМ ТСЕР, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0 в течение 5 мин, помещали на предметное стекло микроскопа и устанавливали в проточную кювету. Суспензию 5×10^{-4} % покрытых антителами МЧ в PBS-T, содержащем 1% БСА, прокачивали через ячейку со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 1-2 мин с помощью шприцевого насоса. Количество МЧ на единицу площади оценивали как в рабочих зонах микрочипа, так и в фоновой зоне, причем для получения средних значений сигнала и фона анализировали не менее 10 зон.

4.2.2. Изготовление и определение характеристик микрочипов с расщепляемым покрытием

Термин «фторсодержащий» используется в работе для удобства для обозначения блокирующего агента или любой поверхности, содержащей перфторацильный фрагмент.

Блокирующий агент получали конденсацией перфторнонановой кислоты с избытком метилового эфира цистина с последующим кислотным гидролизом, как показано на рис. 57А.

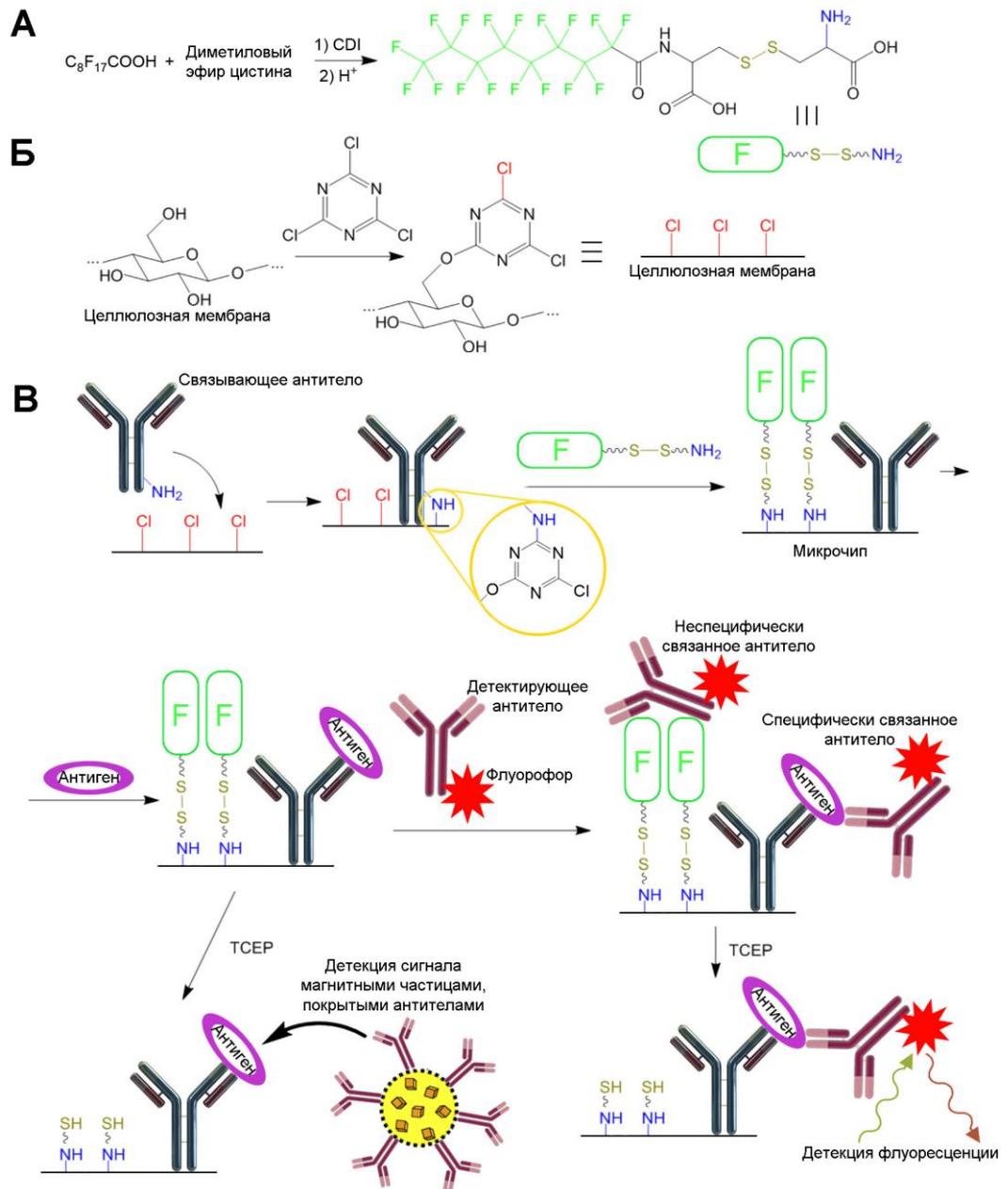


Рис. 57. Схемы изготовления микрочипа (А, Б) и процедура иммуноанализа (В). (А) Синтез фторсодержащего амина; (Б) модификация мембраны цианурхлоридом; (В) антитела иммобилизуют на активированной поверхности целлюлозы, после чего обрабатывают фторсодержащим амином. После связывания антигена и меченых детектирующих антител покрытие удаляется обработкой ТСЕР.

При физиологическом рН перфторациламид устойчив к гидролизу [257] и дисульфидному обмену [258] и при конъюгировании с поверхностью микрочипа может выдержать несколько часов

инкубации. Целлюлозную мембрану активировали хлоридом циануровой кислоты, как описано в [259, 260], оставшиеся остатки хлортриазина инактивировали блокирующим агентом (рис. 57Б, В). В контрольных экспериментах для этого использовали этаноламин, и полученные микрочипы назвали «нативными», поскольку их поверхность по гидрофильности напоминает поверхность нативной целлюлозной мембраны [259]. Для удаления фторсодержащего покрытия дисульфиды расщепляли быстрой (5 мин) обработкой ТСЕР.

Поверхность полученных микрочипов исследовали как на макроскопическом (по углу смачивания), так и на микроскопическом уровне. Однородность фторсодержащего покрытия в наномасштабе была изучена методом АСМ, как описано в [256]. Чем гидрофобнее поверхность, тем больше сила адгезии гидрофобного кантилевера. На основании полученных значений сил сцепления поверхность микрочипа условно была разделена на области с высокой (> 100 пН), средней (10-100 пН) и слабой (< 10 пН) адгезией. Их пространственное распределение и частота появления на различных поверхностях показаны на рис. 58.

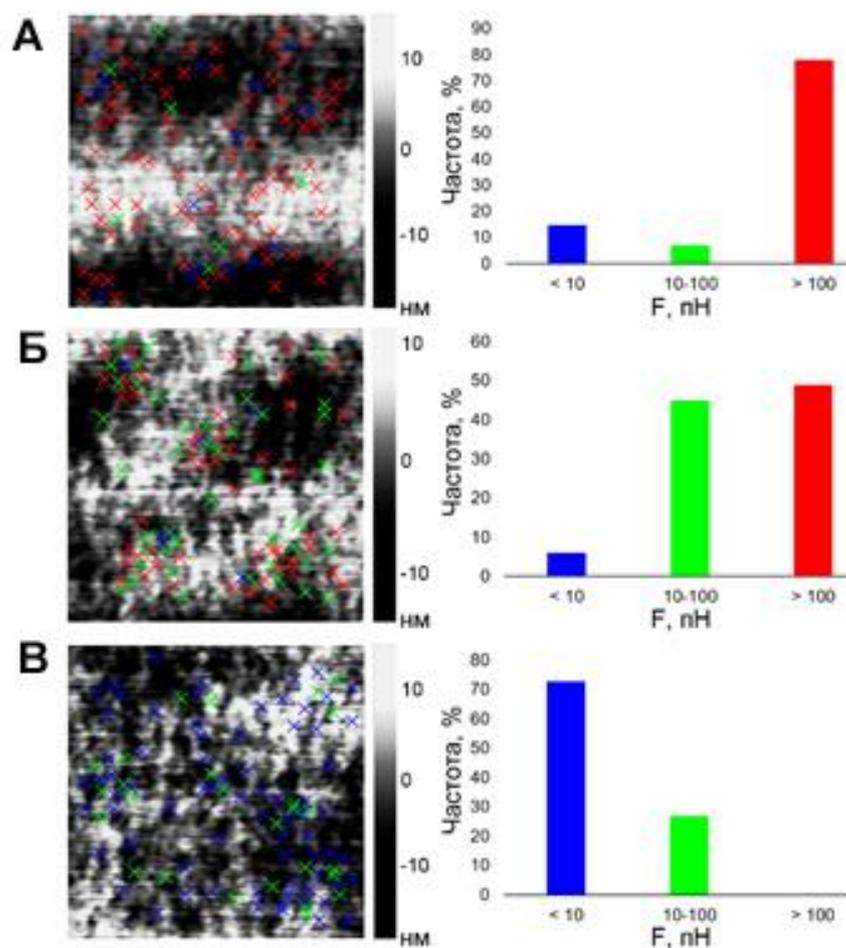


Рис. 58. Распределение сил адгезии гидрофобного кантилевера АСМ, измеренное на различных поверхностях: А) фоновая зона; Б) рабочая зона фторсодержащего микрочипа; В) рабочая зона фторсодержащего микрочипа после обработки ТСЕР. В каждом случае проанализировано 100

позиций. Красные кресты соответствуют участкам с высокой ($F > 100$ пН), зеленые – со средней ($F = 10-100$ пН) и синие - со слабой адгезией ($F < 10$ пН). Площадь сканирования - 1×1 мкм². Справа показаны гистограммы, отображающие общее количество участков с разной адгезией.

В фоновой зоне микрочипа большая часть поверхности имела относительно сильную адгезию к гидрофобному кантилеверу (рис. 58А). В рабочей зоне участки с высокой степенью адгезии, соответствующие фторсодержащему покрытию, оказались смешанными с почти равным количеством участков с меньшей адгезией, которые можно отнести к иммобилизованным белковым молекулам (рис. 58Б). Распределение этих сайтов было очень однородным в масштабе ~ 10 нм. После обработки ТСЕР области с высокой адгезией в рабочей зоне исчезали (рис. 58В), подтверждая факт полного удаления блокирующего покрытия. Большая часть поверхности становилась гидрофильной и имела низкую адгезию, что особо важно для ультрачувствительного анализа с использованием магнитных меток.

4.2.3. Снижение фона в иммунофлуоресцентном анализе на микрочипах с расщепляемым покрытием

Поскольку поверхностный слой, состоящий из фторированных групп, полностью удаляется с микрочипа, естественно предположить, что все адсорбированные на нем вещества также будут удалены. Это открывает путь к снижению фона в анализах на микрочипах. Основная величина, обычно измеряемая в гетерофазных анализах, - отношение сигнал / шум, которое отражает превышение сигнала над вариациями фона. Уменьшение значения среднего фонового сигнала приводит к его меньшим вариациям. Вот почему снижение фона приводит к более высокому отношению сигнал / шум и, как следствие, к более низкому уровню ПрО, как будет показано ниже. В модельных экспериментах для обнаружения СТ был применён иммунофлуоресцентный анализ сэндвич-типа и хорошо охарактеризованные моноклональные антитела [40], одно из которых было помечено красителем Cy5 (рис. 57В). Градуировочный график для анализа СТ на гидрофильном микрочипе приведен на рис. 59.

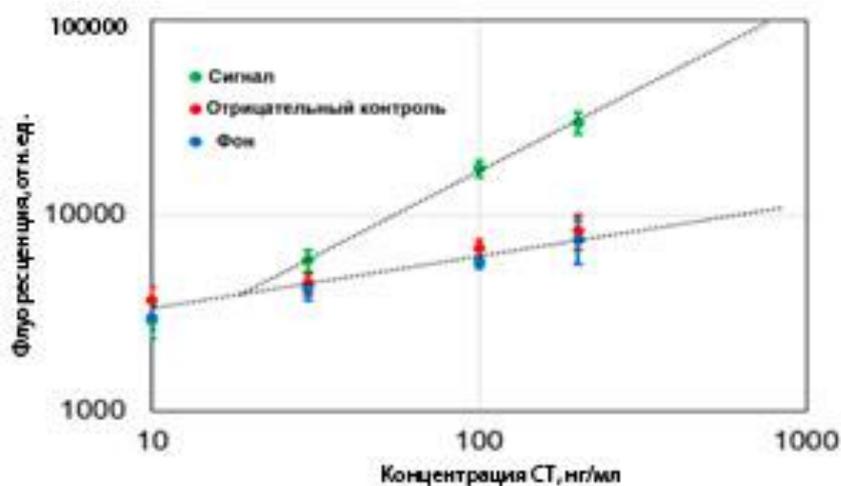


Рис. 59. Градуировочный график для детекции СТ на микрочипе из целлюлозной мембраны, блокированной этаноламином. Пределы погрешностей соответствуют $2.5 \times CO$.

Также были выполнены эксперименты по анализу СТ на фторсодержащих микрочипах без обработки и с обработкой ТСЕР до детекции флуоресцентного сигнала. Для сравнения использовали эпоксилированное стекло, поскольку известно, что такая подложка обеспечивает низкий уровень фона и широко используется на практике [261]. Репрезентативные изображения микрочипов представлены на рис. 60А, рассчитанные значения сигналов показаны на рис. 60Б.

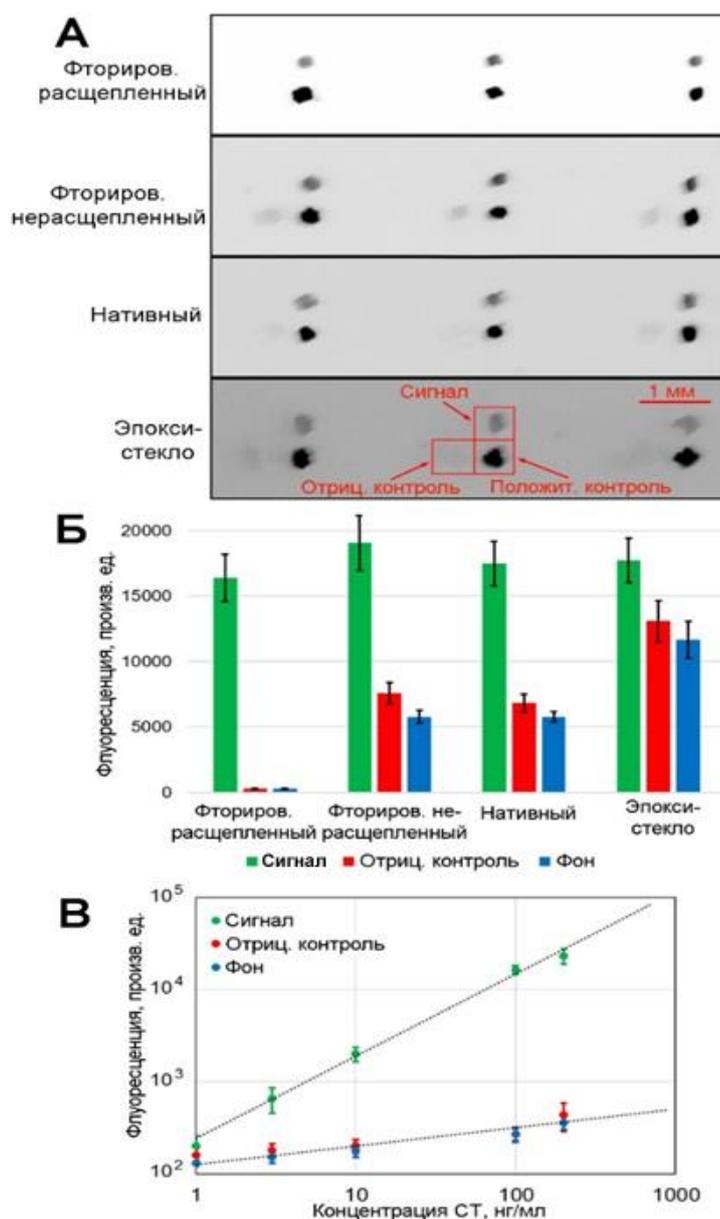


Рис. 60. (А) Иммунофлуоресцентный анализ СТ с использованием различных субстратов: целлюлозная мембрана, блокированная фторсодержащим амином и обработанная ТСЕР; целлюлозная мембрана, блокированная фторсодержащим амином, но не обработанная ТСЕР; «нативная» (блокированная этаноламином) целлюлозная мембрана; стекло с эпоксидированным покрытием. (Б) Сравнение значений сигнала, отрицательного контроля и фона для субстратов, перечисленных выше. Интенсивность всех зон положительного контроля превышала диапазон измерений. (В) Градуировочный график для детекции СТ на фторсодержащих микрочипах, обработанных ТСЕР перед измерением флуоресценции. Пределы погрешностей соответствуют 2.5 x CO.

Значения сигналов автофлуоресценции, которые не видны на рис. 60Б, приведены на рис. 61.

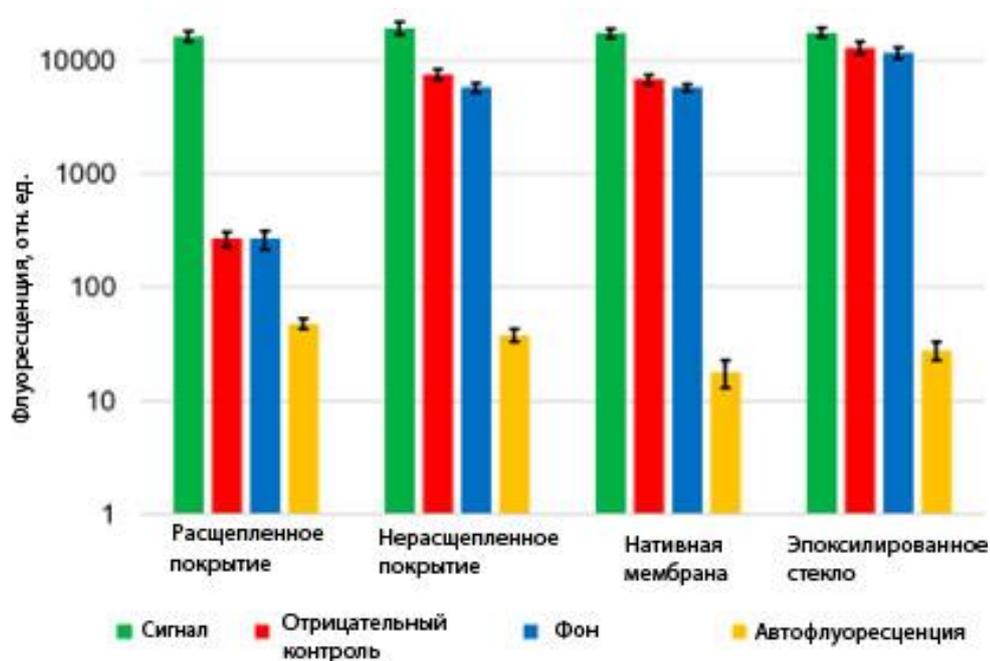


Рис. 61. Сравнение значений сигнала, отрицательного контроля, фона и автофлуоресценции, полученных в иммунофлуоресцентном анализе раствора СТ 100 нг / мл на разных микрочипах в логарифмической шкале.

Подложки из регенерированной целлюлозы с исходно низкой адгезией, блокированные этаноламином, а также обработанные блокирующим агентом, в анализе без расщепления покрытия показали в 2 раза более низкие значения фона и отрицательного контроля, чем эпоксированное стекло. Но обработка фторсодержащего покрытия ТСЕР уменьшило как фон, так и сигнал отрицательного контроля в 30 раз! В то же время сигнал остался почти неизменным, что означает, что, хотя иммуноглобулины содержат дисульфидные связи, ТСЕР не оказывает значительного влияния на активность связывающих антител. Влияние ТСЕР на эффективность иммуноанализа было исследовано дополнительно. Контрольный эксперимент по определению СТ на микрочипе, блокированном этаноламином, проводили по описанному выше протоколу, за исключением того, что микрочип обрабатывали ТСЕР как до, так и после связывания аналита. В обоих случаях наблюдалось только небольшое уменьшение сигнала по сравнению с контролем без обработки ТСЕР (рис. 62). Ранее было показано, что молекулы IgG расщепляются восстанавливающими агентами на равные фрагменты без значительной потери аффинности [262]. В то же время расщепление связывающих антител может понизить сигнал из-за потери связанного аналита, а расщепление детектирующих антител может привести к частичной потере флуоресцентной метки. Однако этот эффект наблюдался лишь в небольшой степени, что объясняется действием нескольких факторов. Антитело может быть связано с поверхностью множественными контактами при достаточно высокой плотности реактивных групп на стадии иммобилизации белка. Таким образом, когда молекула антитела расщепляется, обе ее половины остаются ковалентно

иммобилизованными. Кроме того, так как продолжительность действия ТСЕР мала, некоторые дисульфиды могут избежать восстановления из-за стерических затруднений, и даже полностью расщеплённые детектирующие антитела могут удерживаться вместе в течение опыта за счёт нековалентных взаимодействий.

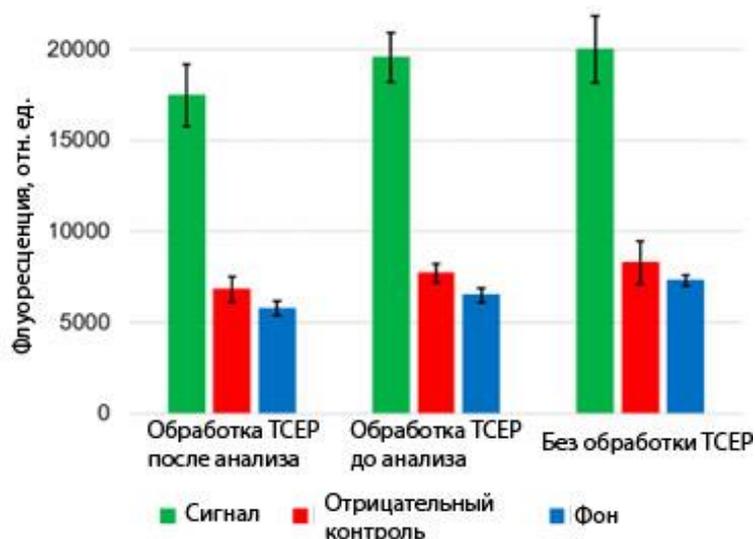


Рис. 62. Значения сигнала, отрицательного контроля и фона, полученные в иммунофлуоресцентных анализах раствора СТ с концентрацией 100 нг / мл на микрочипах, обработанных разными способами.

Чтобы подтвердить, что наблюдаемый эффект не является артефактом конкретных используемых антител, был проведен анализ с другим анализом, интерлейкином IL-1 β , с помощью пары коммерческих моноклональных антител. Для этого использовали биотинилированное вторичное антитело, которое детектировали с помощью Cy5-меченного стрептавидина. Были получены сходные результаты: как фоновый сигнал, так и сигнал отрицательного контроля уменьшились более чем в 10 раз при использовании микрочипов с фторсодержащим покрытием и обработанных ТСЕР перед измерением флуоресценции (рис. 63).

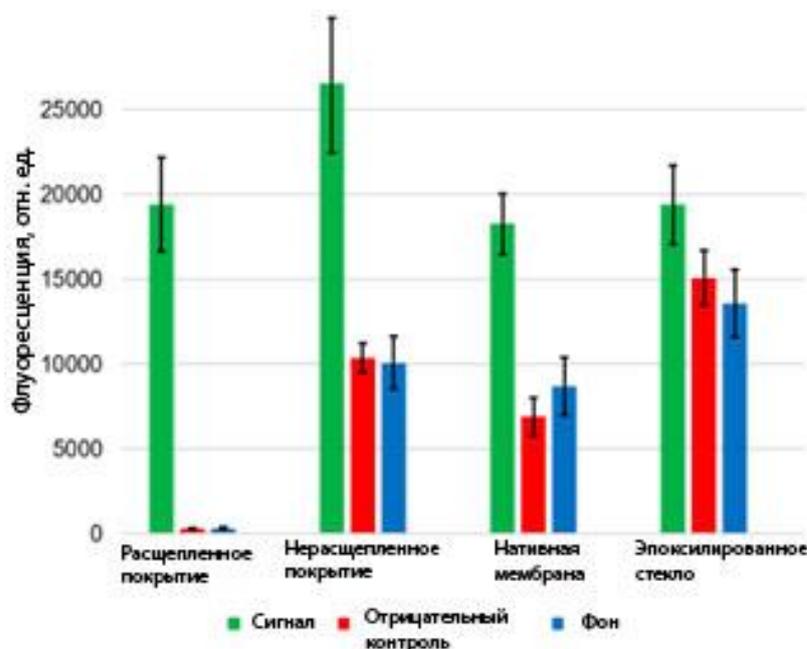


Рис. 63. Значения сигнала, отрицательного контроля и фона, полученные в иммунофлуоресцентном анализе раствора IL-1 β с концентрацией 100 нг / мл с использованием различных субстратов: целлюлозная мембрана, блокированная фторсодержащим амином и обработанная ТСЕР; мембрана, блокированная фторсодержащим амином, но не обработанная ТСЕР; мембрана, блокированная этаноламином («нативная»); стекло с эпоксированным покрытием.

Таким образом, химическое удаление поверхностного слоя микроципа значительно снижает фоновый сигнал, а уменьшение фона вызывает понижение ПрО. Как видно на рис. 60Б), на эпоксированном микроципе при концентрации СТ 100 нг/мл сигнал был лишь немного выше, чем у отрицательного контроля, то есть ПрО данного аналита оказался близок к 100 нг/мл. Для микроципа, блокированного этаноламином, он составил около 30 нг/мл (рис. 59), что отражает более высокое отношение сигнал / шум при использовании субстрата с низким уровнем адгезии. Анализ СТ на микроципах с расщепляемым покрытием показал ПрО 1-3 нг/мл (рис. 60В). В итоге, был достигнут значительный (примерно на порядок) выигрыш в чувствительности анализа, поскольку более низкий фон позволил обнаружить более низкий сигнал. Примечательно, что как расщепляемое блокирование, так и обычно выполняемые анализы продемонстрировали небольшое снижение фона и отрицательного контроля с уменьшением концентрации аналита. Это означает, что не только детектирующее антитело, но и аналит неспецифически сорбировались на поверхности, и оба вносили вклад в фоновый сигнал.

4.2.4. Повышение скорости массопереноса на микроципах с расщепляемым покрытием

Еще одно применение предложенной концепции состоит в управлении специфическими свойствами поверхности микрочипа. В этом разделе будет проиллюстрировано, как это может улучшить характеристики анализа, на примере сверхчувствительного иммуноанализа с детекцией магнитными частицами. В таких анализах проблема неспецифического связывания аналитов или обнаружения антител гораздо менее актуальна, поскольку этот метод имеет дополнительный регулируемый параметр - гидродинамическую силу, действующую на частицы, что позволяет точно различать специфические и неспецифические взаимодействия, при условии, что сам субстрат имеет низкую адгезию [24]. В таких анализах фон близок к нулю без каких-либо дополнительных нововведений, таких как расщепляемая блокировка. Тем не менее, описанная здесь концепция предлагает другое преимущество для иммуноанализов с детекцией магнитными частицами - обратимую гидрофобизацию поверхности микрочипа, которая помогает улучшить массоперенос анализируемого вещества из объема раствора на поверхность с использованием метода циклического “стекания-восполнения” (CDR) [234]. Такой подход может быть легко реализован во вращающейся пробирке, содержащей микрочип с образцом (рис. 64).

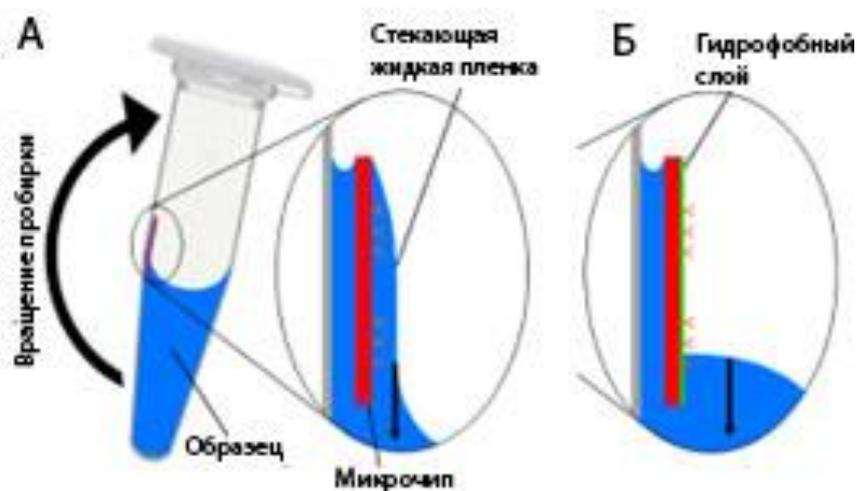


Рис. 64. Схема стекания жидкости с гидрофильной (А) и гидрофобной (В) поверхности микрочипа во вращающейся пробирке.

При вращении пробирки неперемешиваемый жидкий слой не стекает с гидрофильной поверхности микрочипа (рис. 64А), и следовательно, CDR не может ускорить связывание аналита. В то же время любая гидрофобная поверхность характеризуется высокой неспецифической адгезией покрытых белком МЧ, что приводит к повышению фонового сигнала. В этом случае и может помочь расщепляемая блокировка: после связывания аналита гидрофобный микрочип становится гидрофильным, что позволяет эффективно проводить детекцию сигнала магнитными метками. Эффективность такого подхода подтверждена иммуноанализом образцов, содержащих СТ. Аналит сначала связывался с антителами на фторсодержащем микрочипе, находящемся во

вращающейся пробирке. Микрочип хорошо удерживался на стенке пробирки за счёт гидрофильности своей поверхности (фторсодержащим агентом была обработана только одна сторона). Микрочип промывали прямо в пробирке, доставали, расщепляли гидрофобное покрытие и помещали в проточную ячейку для анализа. Сигнал регистрировали сканированием поверхности МЧ, покрытыми антителами против СТ, в сдвиговом потоке при действии магнитного поля. Микрочип состоял из зон антител к СТ и антигену А27L вируса оспы, а также из положительного контроля (белок G, который связывает любые МЧ, покрытые антителами) и отрицательного контроля (БСА), как показано на рис. 65А.

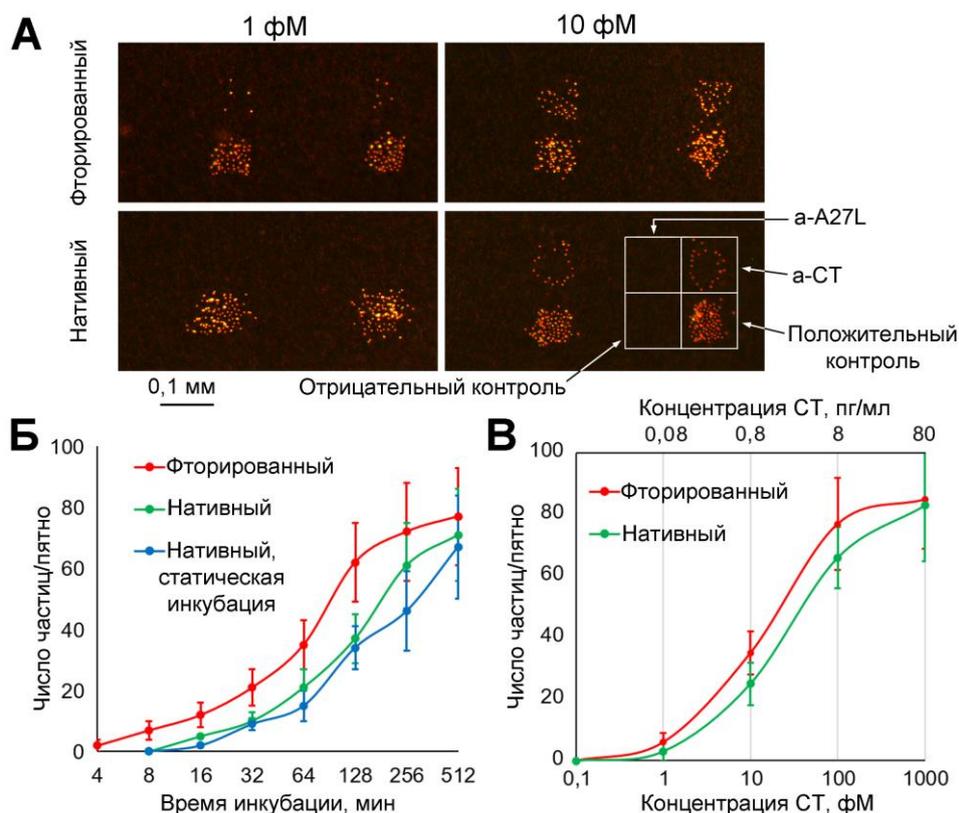


Рис. 65. (А) Результаты иммуноанализа после 1 ч инкубации с указанными концентрациями СТ с использованием фторсодержащих микрочипов и с заблокированной этаноламином («нативной») поверхностью целлюлозы. (Б) Зависимость сигнала иммуноанализа СТ от времени инкубации при использовании CDR и статической инкубации («нативные»). Концентрация аналита - 10 фМ. (В) Градуировочные графики для иммуноанализа СТ на разных микрочипах при инкубации в течение 1 ч с CDR. Пределы погрешностей соответствуют 2,5 x CO.

Из рис. 65 видно, что реализация концепции расщепляемого покрытия ускоряет накопление аналита из образца на микрочипе (рис. 65Б) и делает анализ в 2-3 раза более чувствительным (рис. 65В). Если «нативный» микрочип на основе целлюлозы имеет ПрО около 3 фМ или <0,3 пг/мл после 1 ч инкубации, что чувствительнее традиционного ИФА, то в случае использования

микрочипа с фторированным покрытием ПрО достигает 1 фМ, и это значение является термодинамическим пределом обнаружения. Это можно показать следующими выкладками. Согласно статической модели диффузии [263], молекулярный поток в зоне микрочипа составляет:

$$J = 4DNAca \quad (7),$$

где D - коэффициент диффузии аналита (10^{-6} см² / с для белка среднего размера), c - его концентрация, a - радиус пятна микрочипа (50 мкм). Как показано на рис. 65В, минимальный детектируемый сигнал (3-5 частиц) накапливается за 10-20 мин статической инкубации в 10 фМ растворе СТ. Соответствующий диффузионный поток аналита (1) составляет ~ 1 молекулу за 10 с или ~ 100 молекул за 20 мин. Таким образом, чтобы получить минимально детектируемый сигнал, необходимо иметь в рабочей зоне около 100 молекул. Так как типичное значение плотности иммобилизации антител, Γ , составляет ~ 10^4 молекул на мкм² [264], в зоне размером 100×100 мкм² получается 10^8 центров связывания. Константа равновесия связывания антитела с СТ была определена ранее [40]:

$$K = [Ab*CT]_s / [Ab]_s [CT] \sim 10^9 \quad (8),$$

где s обозначает поверхностную концентрацию. Таким образом, минимальная определяемая равновесная концентрация аналита составляет $[CT] \sim [Ab*CT]_s / K / [Ab]_s = 100/10^9/10^8 = 1$ фМ, что согласуется с экспериментально наблюдаемым пределом обнаружения.

При использовании гидрофильного микрочипа, заблокированного этаноламином, вращение пробирки не ускорило накопление аналита (синие и зеленые кривые на рис. 65Б), скорее всего, из-за перемешиваемого жидкого слоя на микрочипе, через который аналит должен продиффундировать, прежде чем достичь поверхности. При использовании гидрофобного микрочипа часть раствора образца, которая находилась в прямом контакте с микрочипом, полностью обновлялась с каждым циклом вращения пробирки. При скорости вращения 20 об / мин скорость обновления образца составляет примерно один раз в 3 с. Это время сравнимо с характерным временем, необходимым для того, чтобы реакция стала диффузионно-контролируемой [265]:

$$\tau = D / (k\Gamma)^2 \quad (9).$$

Полагая $D \sim 10^{-6}$ см² / с, $\Gamma \sim 10^4$ молекул / мкм² и скорость ассоциации антиген-антитело $k \sim 5 \times 10^5$ М⁻¹с⁻¹ [266], получаем $\tau \sim 1$ с, что близко к времени обновления образца. Таким образом, в каждом цикле вращения пробирки аналит захватывается из объёма прежде, чем реакция связывания начнёт контролироваться диффузией, в результате чего наблюдается её ускорение. Как показано на рис. 65А, в случае гидрофильного «нативного» микрочипа МЧ концентрировались на границе рабочей зоны, что характерно для контролируемого диффузией связывания с более высоким потоком [267]. В то же время при использовании гидрофобного микрочипа со

фторированным покрытием и с процедурой CDR сигнал был более равномерным. Это наблюдение представляет дополнительное доказательство того, что связывание анализита в этом случае не контролируется диффузией.

4.2.5. Иммуноанализ на целые вирусные частицы

Ограничения на диффузию для белков не так сильны, как для более крупных частиц, таких как нанометки полимерных ферментов [234] или вирусы. В данной части работы показано применение микрочипов с расщепляемым покрытием для обнаружения целых частиц вируса осповакцины, который является близким низкопатогенным аналогом возбудителя оспы и для которого ограничения диффузии особенно сильны из-за его большого размера (около 200 нм [268]), а эффект усиленного массообмена более выражен. Обнаружение целых вирусных частиц даёт некоторые практические преимущества. Например, нет необходимости дезинтегрировать вирус на этапе подготовки образца, что позволяет использовать более быстрый и простой протокол. Кроме того, результаты анализа не на активные целые вирусные частицы могут быть ложноположительными из-за присутствия вирус-специфических фрагментов нуклеиновых кислот или вирусных белков. Фторсодержащий микрочип с иммобилизованными антителами к антигену вируса оспы A27L инкубировали в растворе, содержащем вирус, во вращающейся пробирке, и сигнал детектировали сканированием поверхности МЧ, покрытыми антителами против A27L. После 10-часовой инкубации ПрО достиг 10^4 вирусов/мл, а уменьшение времени инкубации в 10 раз (до 1 ч) привело к пропорциональному снижению чувствительности до 10^5 вирусов/мл (рис. 66). Если прирост чувствительности для белкового биомаркера за заданное время инкубации при использовании гидрофобного микрочипа вместо «нативного» составлял 2-3 раза (рис. 65B), то для вируса - более чем на порядок. Эффект для вируса выражен сильнее, т.к. его коэффициент диффузии намного ниже, чем для белков, и его диффузия через неперемешиваемый слой образца, остающийся на гидрофильном микрочипе, происходит очень медленно. Характерное время, необходимое для того, чтобы реакция стала контролируемой диффузией, также уменьшается с понижением коэффициента диффузии, что позволяет предположить, что для анализа вирусов приемлемы гораздо более высокие скорости вращения. Однако в этом случае нельзя гарантировать полное стекание раствора с микрочипа.

Примечательно, что при одинаковой молярной концентрации значение сигнала при анализе вирусных частиц было в 3-4 раза выше, чем для белка. Это может быть связано с более высокой эффективностью обнаружения вирусов, т.к. они имеют на своей поверхности множество сайтов связывания антител, а именно антигенов A27L. Это увеличивает шансы образования связи между анализитом и магнитной меткой. По нашим оценкам, в анализе обнаруживается около 10-20% связанных вирусных частиц, что примерно в 4 раза больше по сравнению с белком. Несмотря на такие, казалось бы, низкие значения, чувствительность детекции магнитными метками

чрезвычайно высока и имеет преимущество по сравнению с широко используемыми методами, в частности, с хемилюминесценцией, как минимум на 2 порядка. Такая высокая чувствительность позволяет достичь субфемтомолярных значений ПрО в различных анализах [22, 259, 261].

Таким образом, предложенный метод позволяет одновременно обнаруживать вирусы и другие биомаркеры в одном анализе при сохранении высокой специфичности (рис. 66(Г)). Специфичность анализа на СТ и вирус осповакцины проиллюстрирована на рис. 65 и рис. 66, причём перекрёстная реактивность между антителами против СТ и А27L не наблюдалась.

Описанная тест-система может иметь практическое значение для мультиплексного обнаружения опасных патогенов различной природы. В таком случае вирусы анализируются напрямую, тогда как бактерии обнаруживаются по секретируемым белковым биомаркерам.

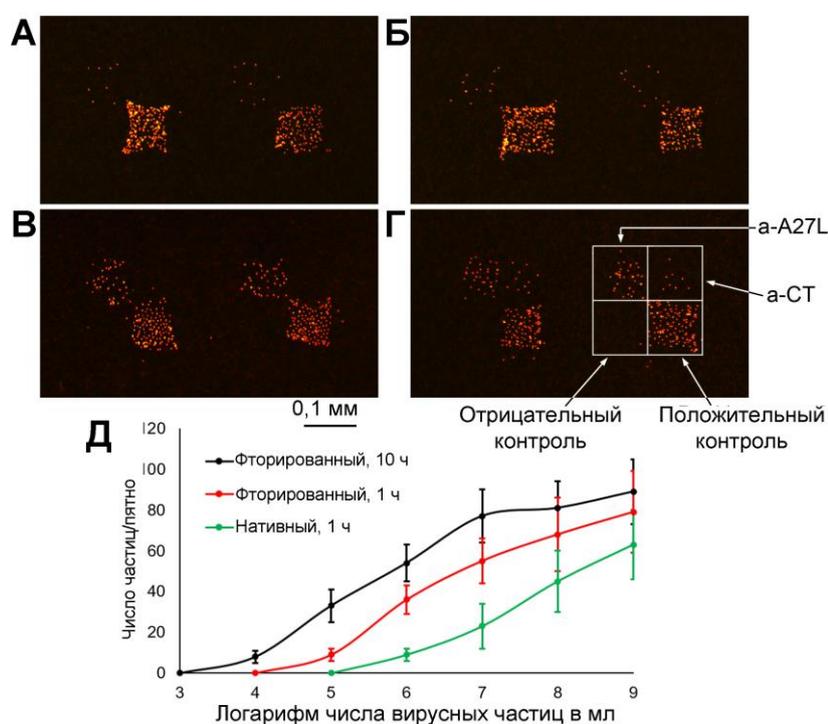


Рис. 66. (А-В) Иммуноанализ целых частиц вируса осповакцины с использованием микрочипа с фторсодержащим покрытием: (А) 10^4 вирусных частицы в мл, 10 ч инкубации; (Б) 10^5 вирусных частиц в мл, 1 ч инкубации; (В) 10^6 вирусных частиц в мл, 1 ч инкубации. (Г) Одновременный иммуноферментный анализ 6×10^5 вирусов осповакцины и 6×10^5 молекул СТ в мл (1 фМ), 1 ч инкубации. (Д) Градуировочные графики для иммуноанализа вируса осповакцины с использованием фторсодержащих и «нативных» (блокированных этаноламином) микрочипов с различным временем инкубации. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$.

В завершение следует заметить, что самые современные методы иммуноанализа часто включают сложное оборудование и специальные устройства, например, микрофлюидные чипы, которые контактируют с раствором образца. Если анализируются опасные патогены, это оборудование надо подвергать дополнительным процедурам мойки / дезинфекции. Напротив, особенность предлагаемой экспериментальной методики состоит в том, что образец контактирует только с одноразовой пробиркой. Вот почему мы считаем, что этот метод больше подходит для широкомасштабного практического использования, чем ранее опубликованные тесты с детекцией магнитными частицами.

4.2.6. Выводы к разделу 4.2.

Предлагаемые в настоящей работе инновации в технологии изготовления микрочипов и способе проведения анализа значительно снижают предел обнаружения за счёт уменьшения фонового сигнала и сокращают время анализа. На стадии изготовления микрочипа на поверхности формируется расщепляемое покрытие, которое придает ей желаемые свойства и защищает от неспецифической адсорбции аналита или других веществ, присутствующих в образце. Перед обнаружением сигнала покрытие химически удаляется. В результате эффективность анализа улучшается за счёт снижения фона и ускорения массопереноса аналита. Использование расщепляемого покрытия в сочетании с детекцией сигнала МЧ позволяет обнаруживать целые вирусы одновременно с белковыми биомаркерами с ультравысокой чувствительностью. Разработанный подход может быть применён также для контроля прикрепления клеток [243] или для контролируемого и количественного высвобождения адсорбированных веществ с поверхности адсорбента при фракционировании. Возможно его применение не только *in vitro*, но и *in vivo*, например, при регулировании свойств поверхности наночастиц, используемых в качестве диагностических или фармацевтических инструментов [242]. В частности, дисульфидные линкеры покрытия могут расщепляться внутриклеточным глутатионом при поглощении наночастиц клетками.

4.3. Диагностика рака почки, мочевого пузыря и предстательной железы по раково-сетчаточным антигенам в моче

Поиск новых диагностических тестов на рак или способов улучшения существующих тестов в первую очередь обусловлен желанием выявить болезнь на ранних стадиях. Известно, что некоторые фоторецепторные белки, такие как аррестин и рековерин, экспрессируются как раково-сетчаточные антигены в разных злокачественных опухолях. Это подтверждено определением антигенов как в тканях злокачественной опухоли, так и аутоантител к ним в сыворотке крови. Однако применение этих белков в качестве онкомаркеров может быть ограничено недостаточной чувствительностью традиционных методов иммуноанализа, которые неспособны детектировать

крайне низкие концентрации данных антигенов. Используя ультрачувствительный мультиплексный иммуноанализ на микрочипах с детекцией магнитными метками, имеющий ПрО 1 пг/мл, было исследовано, могут ли данные антигены служить диагностическими и предиктивными биомаркерами почечно-клеточной карциномы (почечно-клеточный рак, ПКР), рака мочевого пузыря (РМП) и предстательной железы (РПЖ).

При обнаружении рака на ранних стадиях, удаление опухоли или другие терапевтические методы могут привести к полному излечению. Однако для диагностики часто требуются высокоинвазивные процедуры, такие как биопсия, в то время как неинвазивные подходы по-прежнему представляют серьезную проблему. Почечно-клеточная карцинома является наиболее распространенным урологическим злокачественным новообразованием с высокой смертностью. Существующие методы диагностики, компьютерная (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастным усилением и даже ультразвуковое исследование (УЗИ), обладают достаточно высокой диагностической точностью. Однако эти методы не всегда позволяют дифференцировать доброкачественные опухоли почки. Кроме того, лучевые методы не всегда позволяют проводить контроль за системной таргетной или иммунотерапией, за радикальностью удаления опухоли или её разрушения при криоабляции и т.д. Поэтому для расширения диагностических возможностей в последнее время всё большее внимание стали уделять поиску и изучению специфических биомаркеров. К настоящему моменту в качестве диагностических, предиктивных или прогностических биомаркеров ПКР рассматриваются белковые маркеры, специфичные для опухолевой ткани [270], сигнатуры экспрессии генов [271], тканевой экспрессии микроРНК [272], мутации генов [273] и др. Очевидно, что молекулярные биомаркеры ПКР, представленные в жидкой биопсии, предпочтительнее полученных из опухолевой ткани ввиду неинвазивной процедуры взятия образцов. Однако примеры анализа сыворотки крови или мочи при диагностике ПКР встречаются в литературе гораздо реже, чем при других злокачественных новообразованиях [274]. В частности, крайне мало имеется данных о белках крови, используемых в качестве биомаркеров ПКР [275]. Наиболее перспективными представляются белковые мочевые маркеры, поскольку моча находится в непосредственном контакте с опухолью и содержит намного меньше общего белка, чем сыворотка. На сегодняшний день биомаркеры рака мочевыводящих путей подробно описаны в недавно опубликованных обзорах [276, 277]. Из многочисленных мочевых биомаркеров аквапорин-1 с перилипином-2 (PLIN2), карбоангидраза IX (CAIX), белок, ингибирующий Raf-киназу (RKIP), белок ядерного матрикса-22, белок14-3-3 β/α и липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой, считаются наиболее перспективными в диагностике рака почки. Для их детекции используют различные аналитические методы, и их характеристикам в последнее время уделяют повышенное внимание [277]. В большинстве случаев применяют наборы для ИФА, а для повышения чувствительности в ряде случаев используют

Вестерн-блоттинг, например, для обнаружения PLIN2 [278, 279]. В дальнейшем было показано, что PLIN2 в моче может быть надежно обнаружен с помощью биоплазмонного анализа на бумаге [280]. Для идентификации RKIP была применена масс-спектрометрия [281]. В дополнение к этим маркерам, с помощью других методов в моче были обнаружены белки, также классифицированные как биомаркеры ПКР [282]. К сожалению, ни один из этих подходов до сих пор не апробирован в клинической практике. Некоторые биомаркеры не прошли валидацию из-за низкой чувствительности или специфичности, несоответствий в дизайне исследования или вариабельности анализа. Одним из путей решения этих проблем является поиск новых биомаркеров с использованием высокочувствительных технологий [283]. Как было показано ранее, в злокачественных опухолях aberrantly экспрессируется ряд белков, специфичных для иммунопривилегированных зон, таких как фоторецепторные белки (рековерин, аррестин, трансдуцин, родопсинкиназа и др.) [284-287]. Известно, что аутоантитела против рековерина, аррестина, трансдуцина и родопсина иногда обнаруживаются в сыворотке крови пациентов с меланома-ассоциированным синдромом ретинопатии [286-288]. Однако работ по выявлению раково-сетчаточных антигенов в жидкой биопсии больных ПКР, насколько нам известно, на настоящий момент нет.

Поиск биомаркеров РМП также активно ведётся в последние десятилетия. Актуальность темы подтверждается большим количеством публикаций за последние годы [289-292]. В табл. 16 представлена информация о белковых биомаркерах, как одиночных, так и составляющих панель, с наилучшими значениями диагностической чувствительности и специфичности. Данные одобренных FDA тестов мочи на РМП не приведены из-за низкой чувствительности.

Таблица 16. Наиболее перспективные диагностические белковые биомаркеры мочи для выявления РМП.

Биомаркер	Метод детекции	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точность, % или AUC	Примечания	Ссылки
HA; HAse	Мета-анализ	90.8	82.5	AUC=0.94	–	293
Цитокератины 8 и 18	ИФА (UBC® Rapid Test)	86.9	90.9	AUC=0.75	Пороговая концентрация 10 нг/мл	294
Сурвивин	ИФА	35	98	–	Пороговая концентрация 33 пг/мл	295
ORM1	ИФА	91.96	94.34	93 AUC=0.965	–	296
sFas	ИФА	88.03	91.9	AUC=0.912	Порог. конц.– 174 пг/мл	297

HtrA1	ИФА	92.65	95.59	94	–	298
	Вестерн-блот	–	–	AUC=0.983	–	
Tumor M2-PK	ИФА	82	–	–	–	299
CD147	ИФА	97	100	–	–	300
CCL18	ИФА	86	87	AUC=0.919	–	301
CCL18; PAI; CD44		–	–	AUC=0.938	–	
Coronin-1A; A4; g-Synuclein; Semenogelin-2; DJ-1	ИФА (неин- вазивный РМП)	79.2	100	85.3 AUC=0.92	Хорошее соответствие между Вестерн- блотом и RT- PCR	302
	Вестерн-блот (неинвазивный РМП)	93.9	96.7	94.8 AUC=0.98		
	ИФА (неин- вазивный РМП)	86.4	100	90.6 AUC=0.94		
	Вестерн-блот (инвазивный РМП)	100	100	100		
ANG; APOE; A1AT; CA9; IL8; MMP9; MMP10; PAI1; SDC1; VEGF	Мультиплекси- ый анализ (Oncuria™)	–	–	–	LOD: IL8 = 0.295 пг/мл, APOE= 31.1 пг/мл	303

Несмотря на то что некоторые биомаркеры демонстрируют как высокую чувствительность, так и специфичность, превышающую 90%, они не применяются в клинической практике. Усилия по повышению эффективности анализа в основном сосредоточены на объединении известных биомаркеров. Анализ литературных данных показывает, что комбинация нескольких биомаркеров, каждый из которых несет независимую диагностическую информацию, повышает точность обнаружения рака [299, 302, 303], однако на горизонте клинического использования мультиплексного анализа белков нет.

Рак предстательной железы (РПЖ) является одной из наиболее частых причин смерти мужчин от рака. Обычно его подозревают на основании ректального исследования и/или уровней в сыворотке крови простатического специфического антигена (ПСА). Применение ПСА в качестве сывороточного маркера произвело революцию в диагностике РПЖ, несмотря на его ограниченную чувствительность и специфичность [304]. До сих пор ПСА остаётся единственным диагностическим биомаркером РПЖ, который рекомендован для широкого практического использования. В последние годы были предложены новые биомаркеры РПЖ, определяемые в

моче и плазме [305-308]. Из мочевых биомаркеров последнего поколения наибольшее внимание привлекают PCA3 (Progenza), SelectMDx, MiPS, ExoDx [309]. Ряд тестов, например, PCA3 и SelectMDx, направлен на выявление в моче специфичной мРНК. Согласно данным метаанализа, чувствительность теста PCA3 составляет 46,9–82,3%, специфичность — 56,3–89% [310]. SelectMDx показал обнадеживающие результаты с AUC = 0.90 [311]. Тест ExoDx Prostate (IntelliScore) предсказывает РПЖ с AUC = 0.80 [312]. Однако в настоящее время как оценка MiPS, так и анализ ExoDx считаются экспериментальными. Таким образом, на основании имеющихся данных можно говорить о низкой эффективности известных биомаркеров в диагностике РПЖ.

Как уже было сказано, наиболее распространенными методами для обнаружения белковых биомаркеров являются хорошо разработанные методы ИФА и Вестерн-блоттинг. Пределы обнаружения этих методов определяются фундаментальными факторами, такими как диффузионные ограничения во время доставки аналита к поверхностным зондам и термодинамика комплекса антиген-антитело [283]. Если концентрация биомаркера ниже установленного значения, которое в случае ИФА составляет около 10-100 пг/мл, биомаркер не будет обнаружен. Для раскрытия диагностического потенциала новых маркеров необходимы более чувствительные методы иммуноанализа с уровнем ПрО ниже, чем у традиционных подходов. Важно отметить, что повышение чувствительности иммуноанализа, без учета пороговой концентрации, не всегда может улучшить детекцию известных биомаркеров. Даже обычные методы, имеющие относительно высокий ПрО, часто дают ложноположительные результаты, потому что биомаркеры рака присутствуют не только в образцах больных пациентов, но и у здоровых людей. Чтобы отсеять ложноположительные результаты, следует выбрать правильную пороговую концентрацию биомаркера. Таким образом, мы не видим причин для использования более чувствительного анализа для детекции известных биомаркеров.

4.3.1. Материалы и методы исследования

Рекомбинантные антигены и некоторые поликлональные антитела были получены в лаборатории проф. А.А. Замятина (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова): аррестин, рековерин, родопсинкиназа и трансдуцин человека - в виде полноразмерных рекомбинантных белков, фосфодиэстераза - в виде рекомбинантного фрагмента aa111-190. Эти белки использовали в качестве иммуногенов для получения соответствующих поликлональных антител. Затем подбирали рабочие пары антител (связывающие – для иммобилизации на микрочипах, детектирующие – для иммобилизации на магнитных частицах). Были протестированы все возможные комбинации пар антител для каждого из антигенов.

Аррестин:

1 - моноклональные антитела sc-271159, Santa Cruz Biotechnology,

2 - поликлональные антитела PA5-97471, Invitrogen,

3 – поликлональные аффинно-очищенные антитела кролика.

Проверяемые пары антител (связывание - обнаружение): 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3, 3-1, 3-2, 3-3.

Рековерин:

1 - моноклональные антитела LS-C139407, Lifespan Biosciences,

2 - поликлональные аффинно-очищенные антитела кролика.

Проверяемые пары антител (связывание - обнаружение): 1-2, 2-1, 2-2.

Фосфодиэстераза:

1 – поликлональные антитела orb312706, Биорбыт,

2 - поликлональные аффинно-очищенные антитела кролика.

Проверяемые пары антител (связывание - обнаружение): 1-1, 1-2, 2-1, 2-2.

Родопсинкиназа:

1 – моноклональные антитела LS-C198087, Lifespan Biosciences,

2 – поликлональные антитела LS-C327488, Lifespan Biosciences,

3 - поликлональные аффинно-очищенные антитела кролика.

Проверяемые пары антител (связывание - обнаружение): 1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3, 3-1, 3-2, 3-3.

Трансдуцин:

1 - поликлональные антитела LS-C321680, Lifespan Biosciences,

2 - поликлональные антитела LS-C383874, Lifespan Biosciences,

3 - поликлональные аффинно-очищенные антитела кролика.

Проверяемые пары антител (связывание - обнаружение): 1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3, 3-1, 3-2, 3-3.

Детектирующие антитела конъюгировали с магнитными частицами в соответствии с протоколом производителя. Микрочипы инкубировали в растворе образца, содержащем 1 мкг/мл соответствующего антигена в PBS-T + 1% BSA, в течение 1 ч. Микрочипы промывали, а затем с помощью магнитных частиц, покрытых антителами, определяли эффективность антигена с помощью метода «push-pull», описанного ранее. Пара антител считалась рабочей, если сигнал в модельном анализе превышал 3×10^4 частиц/мм², а сигнал отрицательного контроля (без антигена в растворе образца) не превышал 100 частиц/мм². Если таких пар для антигена было несколько, в дальнейшей работе использовалась та пара, которая давала самую высокую интенсивность сигнала. Для анализа были отобраны следующие пары антител:

Аррестин: 1-3

Рековерин: 2-2

Фосфодиэстераза: нет рабочих пар

Родопсинкиназа: 1-3

Трансдуцин: 3-2

Поскольку для фосфодиэстеразы не было найдено рабочих пар, в мультиплексном анализе после проверки перекрестной реактивности и отрицательного контроля использовали четыре аналита.

Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г., пересмотренной в 2008 г., они были также одобрены Этическим комитетом Сеченовского университета (№10-18; 17/11/2018). Сбор проб проводился в Институте урологии и репродуктивного здоровья Сеченовского университета в 2019-2021 гг. От всех пациентов, принимавших участие в исследовании, было получено письменное согласие. Диагноз подтверждался гистологическим исследованием образцов ткани, полученных в ходе оперативного лечения. Образцы мочи, сыворотки и опухолевой ткани хранили при -80 °С.

Среди больных РМП было 32 мужчины и 8 женщин; медианный возраст (диапазон) составил 66 (30-86) и 68 (48-81) лет для больных РМП и РПЖ соответственно. Количество больных РМП с разными стадиями опухоли составили: T1 – 32, T2 – 2, T3 – 1, T4 – 5 (T1 соответствует наиболее лёгкой стадии с наименьшим размером опухоли); в случае РПЖ: T1 – 38, T2 – 1, T3 – 1, T4 – 0. У всех пациентов метастазы в отдалённые органы и лимфоузлы отсутствовали. Содержание простатического специфического антигена в сыворотке больных РПЖ определяли с помощью стандартных коммерческих наборов.

Проведение иммуноанализа и статистическая обработка результатов

Белковые микрочипы на основе мембраны из целлюлозы получали ЭР, как описано ранее. Микрочип помещали в пробирку с образцом (1-1,5 мл) и инкубировали в течение ночи при +4 °С с вращением со скоростью 20 об/мин. Не доставая из пробирки, микрочип промывали водой и фиксировали в проточной ячейке, под которую устанавливали магнит. Суспензию МЧ, конъюгированных с антителами к исследуемым антигенам, с общей концентрацией $10^{-3}\%$ прокачивали через ячейку в течение 2–3 мин со скоростью 10 мкл/мин. Изображения микрочипа получали с помощью оптического микроскопа с темнопольным осветителем. При этом в каждом эксперименте анализировалось большое число (до 1000) связанных на поверхности микрочипа магнитных частиц, что позволило определить статистическую значимость результата анализа для каждого образца мочи. Оказалось, что динамический диапазон составляет всего один порядок с большими вариациями сигнала, что серьезно ограничивает потенциальную диагностическую эффективность анализа. При высоких концентрациях аналита МЧ концентрируются на правом краю рабочей зоны микрочипа при движении справа налево (рис. 67А). Это дает представление о том, как улучшить количественное определение аналита. Была внесена полуэмпирическая поправка к расчёту количества частиц, N , в активной зоне делением N на среднее расстояние $\langle L \rangle$ от частицы до правой границы зоны:

$$N' = N \times 0.85r / \langle L \rangle (10),$$

где r — радиус пятна. Чем ближе частица к правой границе, тем сильнее сигнал. Фактор 0,85 получается следующим образом. Предположим, что частицы равномерно распределены по зоне с радиусом r .

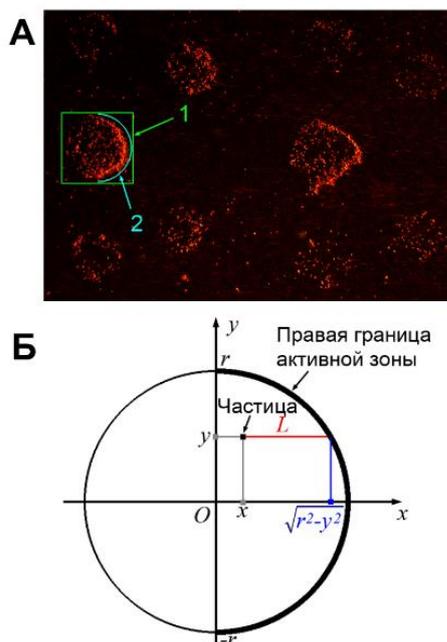


Рис. 67. (А) Выбор отдельных точек для расчета значений сигнала. 1 – граница изображения, содержащая одно пятно. 2 – полукруг, вписанный в границы изображения (1). (Б) Схематическая иллюстрация расчёта среднего расстояния частицы до правой границы пятна.

Если начало координат находится в центре пятна, то среднее положение частицы по оси x равно 0. Таким образом, для данного y среднее расстояние до правой границы L равно $(r^2 - y^2)^{1/2}$ (рис. 67Б). Чтобы вычислить среднее, значения должны быть взвешены по $(r^2 - y^2)^{1/2}$, поскольку количество частиц в горизонтальном срезе круга пропорционально ширине этого среза:

$$\langle L \rangle = \frac{\int_{-r}^r (\sqrt{r^2 - y^2})^2 dy}{\int_{-r}^r \sqrt{r^2 - y^2} dy} = \frac{\int_{-r}^r (r^2 - y^2) dy}{\int_{-r}^r \sqrt{r^2 - y^2} dy} = 8r/3\pi \quad (11).$$

При равномерном распределении частиц по пятну, $\langle L \rangle = 8/3\pi \times r \approx 0,85r$. Поправка в этом случае равна единице, а $N' = N$. Использование N' вместо N в качестве значения сигнала анализа привело к снижению вариаций сигнала и увеличению динамического диапазона на два порядка (рис. 68 Г). Эта поправка применялась во всех анализах, выполненных в данной части работы.

Для расчёта фонового сигнала использовали пространство вокруг активных зон. Типичные значения фона варьировали от 0 до 500 и 0-1000 частиц/мм² для мочи и сыворотки соответственно. Поскольку площадь зоны составляла $(2,0 \pm 0,5) \times 10^4$ мкм², эти значения соответствуют 0–10 и 0–20 частиц/пятно.

Для оценки различий между опытными и контрольной группами использовали χ^2 -тест; для определения различий в содержании аррестина и рековерина до и после операции – критерий знаков; для определения различий в содержании ПСА – критерий Манна–Уитни. Для концентраций раково-сетчаточных антигенов в моче рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена. Расчёты осуществлялись в OriginPro 2018. Варьируя значение пороговой концентрации (0,1; 0,3; 1; 3;10 пг/мл), строили ROC-кривые (receiver operator characteristic), представляющие собой зависимость доли истинно положительных от доли ложноположительных результатов. Для оценки предсказательной способности биомаркеров определяли площадь под ROC-кривой (AUC, area under curve). По построению, площадь под кривой, равная 1, соответствует идеальной предсказательной способности, а при AUC, равной $\frac{1}{2}$, предсказательная способность полностью отсутствует. Для оценки доверительных интервалов значений AUC использовали бинормальную модель [313].

Детекция аррестина и рековерина с помощью обычного ИФА

ИФА аррестина и рековерина выполняли согласно общему протоколу с использованием тех же пар антител, как и для ультрачувствительного иммуноанализа. Детектирующие антитела биотинилировали биотин-сульфо-NHS эфиром (Sigma) в соответствии с протоколом производителя. Для обнаружения биотиновой метки использовали стрептавидин-щелочную фосфатазу и субстрат п-нитрофенилфосфат (Sigma). Рабочие концентрации детектирующих антител и конъюгата составляли 10 мкг/мл. Рассчитанный с помощью градуировочных графиков ПрО составляет около 1 нг/мл для обоих антигенов (рис. 68).

4.3.2. Мультиплексная тест-система для определения раково-сетчаточных антигенов

Из списка известных раково-сетчаточных антигенов были выбраны четыре: аррестин, рековерин, трансдуцин и родопсинкиназа, для которых были отобраны пары антител. Микрочипы изготавливали электрораспылением связывающих антител на мембрану из регенерированной целлюлозы по схеме, представленной на рис. 68А. Дизайн микрочипа позволил максимально упростить задачу его позиционирования в ячейке и последующий анализ изображений. Дополнительным преимуществом микрочипов в данном анализе является возможность их применения в потенциально опасных биологических средах без контакта с используемым оборудованием. Показано, что для всех четырех аналитов значение ПрО составляет 0,1 пг/мл (рис. 68В). Общий для всех аналитов градуировочный график приведён на рис. 68Г (выделен чёрным цветом), статистически неразличимые кривые для отдельных антигенов - на рис. 69. Таким образом, разработанный способ позволяет оценивать концентрации четырех антигенов в диапазоне 0,1–10 пг/мл с точностью полпорядка.

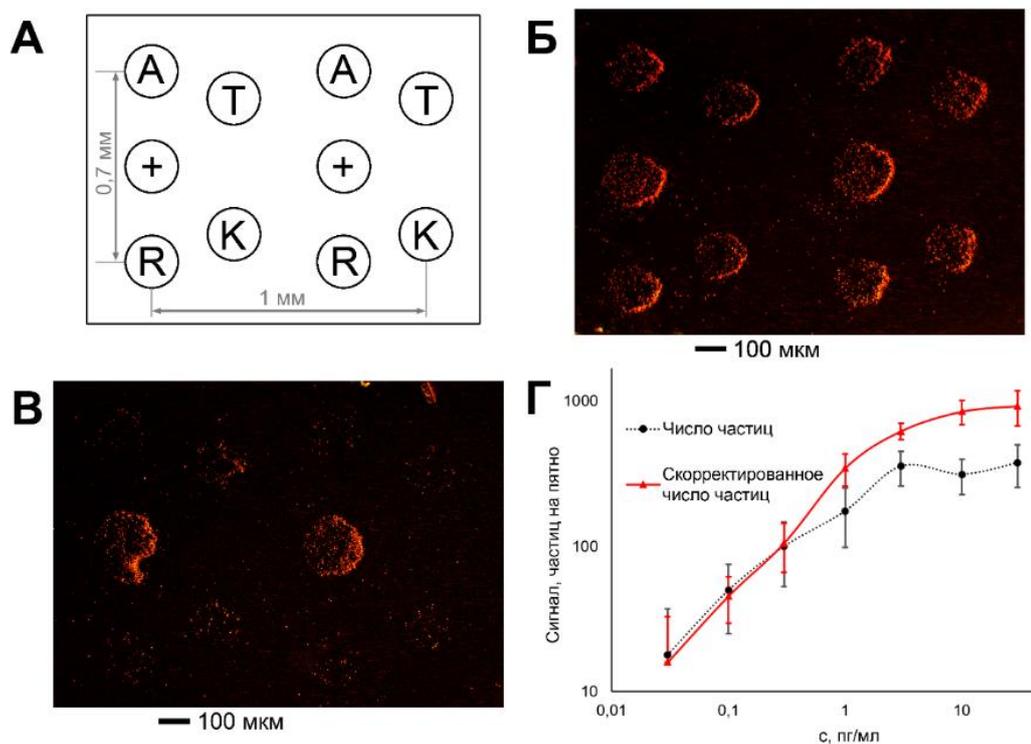


Рис. 68. (А) Дизайн микрочипа, используемого в иммуноанализе. А, R, К и Т обозначают зоны антител, специфичных к аррестину, рековерину, родопсинкиназе и трансдуцину соответственно; знак + означает положительный контроль (рекомбинантный рековерин); (Б, В) Изображения микрочипов, полученные при одновременном иммуноанализе 0,1 нг/мл (Б) и 0,1 пг/мл (В) каждого из четырёх аналитов; (Г) Градуировочные графики, общие для всех аналитов, основанные на расчёте сигнала по количеству частиц в пятне (пунктирная черная кривая) и по скорректированной методике (сплошная красная кривая). Пределы погрешностей соответствуют 2,5 x CO.

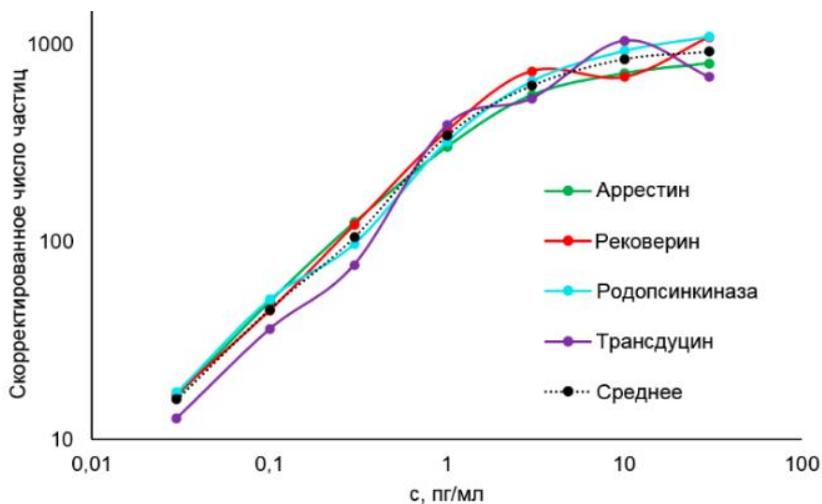


Рис. 69. Градуировочные кривые для отдельных антигенов. Пределы погрешностей опущены для ясности изображения.

4.3.3. Исследование образцов больных почечно-клеточным раком

Количество вовлеченных в эксперимент пациентов было выбрано как минимум таким же, как обычно принято в подобных работах [289]. В общей сложности в исследование были включены 89 пациентов с ПКР (68 пациентов со светлоклеточным, шесть с хромофобным, 14 с папиллярным типом 1 или 2, один - с дефицитом сукцинатдегидрогеназы и 50 контрольных пациентов с мочекаменной болезнью, доброкачественной гиперплазией предстательной железы, простой почечной недостаточностью, кистой и гидронефрозом (табл. 17). У пациентов с pT3-pT4 выполняли регионарную лимфаденэктомию и оценивали наличие поражения лимфатических узлов.

Таблица 17. Демографические и клинические характеристики пациентов с ПКР, участвовавших в исследовании.

Характеристики		ПКР	Контроли
Общее число пациентов		89	50
Средний возраст (диапазон), годы		59 (31-88)	66 (42-82)
Пол	Мужской	52	31
	Женский	37	19
Тип опухоли	Светло-клеточный рак	68	- ¹
	Хромофобный рак	6	
	Папиллярный (тип 1 + тип 2)	14	
	С дефицитом сукцинат-дегидрогеназы	1	
Стадия опухоли	T1a	53	- ¹
	T1b	22	
	T2	3	
	T3	10	
	T4	1	

¹В контрольной группе 25 пациентов имели мочекаменную болезнь, 18 – доброкачественную гиперплазию предстательной железы, 3 – стриктуру уретры, 3 – гидронефроз и 1 – кисты почки.

Было проведено сравнение содержания раково-сетчаточных антигенов в образцах сыворотки крови и мочи больных ПКР, собранных до нефрэктомии, с контрольной группой. После анализа сывороток 25 пациентов с ПКР и 15 контрольных пациентов стало ясно, что ни один из использованных биомаркеров не обладает предсказательной силой. Соответствующие кривые ROC, представленные на рис. 70, дают значение AUC $0,5 \pm 0,1$. По этой причине анализы сыворотки крови больше не проводились.

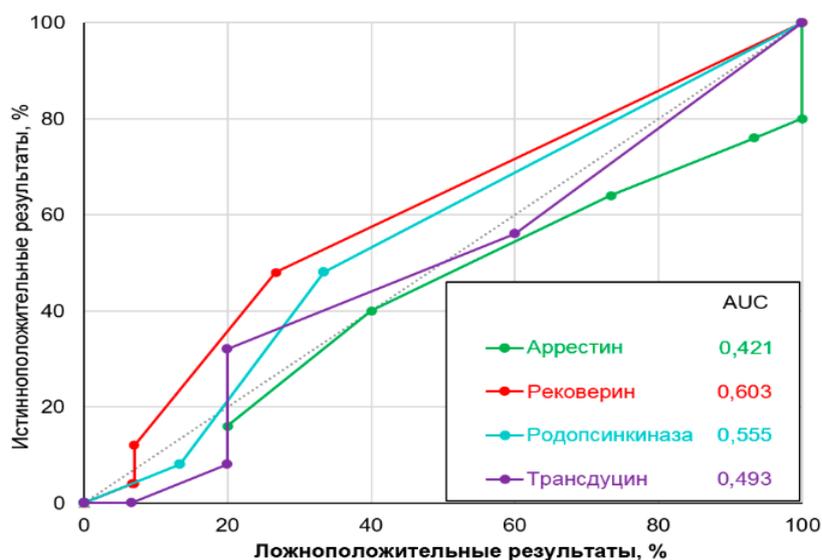


Рис. 70. ROC – кривые для детекции четырех отдельных раково-сетчаточных антигенов в сыворотке крови. Размер выборки - 25 пациентов с ПКР и 15 человек из контрольной группы.

Мочевые биомаркеры оказались более эффективными, и для них было собрано больше данных. Для оценки предварительных значений их эффективности использовали образцы мочи 59 больных ПКР и 50 контрольных пациентов. Репрезентативные примеры изображений микрочипов представлены на рис. 71.

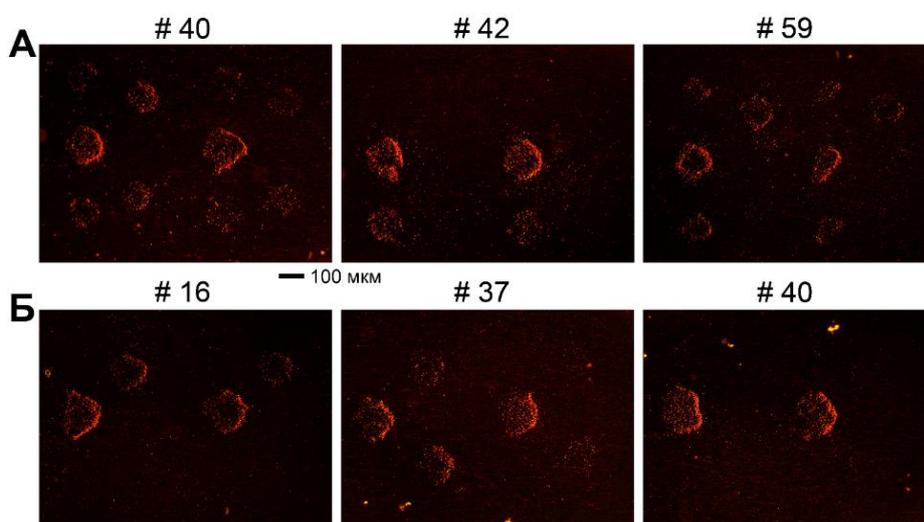


Рис. 71. (А) Репрезентативные примеры результатов иммуноанализа мочи пациентов с ПКР и (Б) контрольной группы. Номера образцов соответствуют данным табл. 18 (А) и 19 (Б). Дизайн микрочипов представлен на рис. 68А. Масштабная линейка является общей для всех изображений.

Расчётные значения AUC для родопсинкиназы и трансдуцина составили всего 0,65 (95% ДИ 0,55– 0,76) и 0,64 (95% ДИ 0,54–0,75) соответственно (рис. 72А). Так как аррестин и рековерин показали более высокую эффективность, было дополнительно проанализировано 30 образцов

мочи пациентов с ПКР, так что общее количество образцов составило 89. Окончательные оценки AUC для аррестина и рековерина составили 0,93 (95% ДИ 0,89–0,97) и 0,82 (95% ДИ 0,75–0,89). Гистограммы, показывающие распределение содержания антигенов в образцах мочи при ПКР и контролях, представлены на рис. 72Б. Общие результаты анализа образцов мочи и сыворотки, по которым были оценены значения AUC, приведены в табл. 18 и 19.

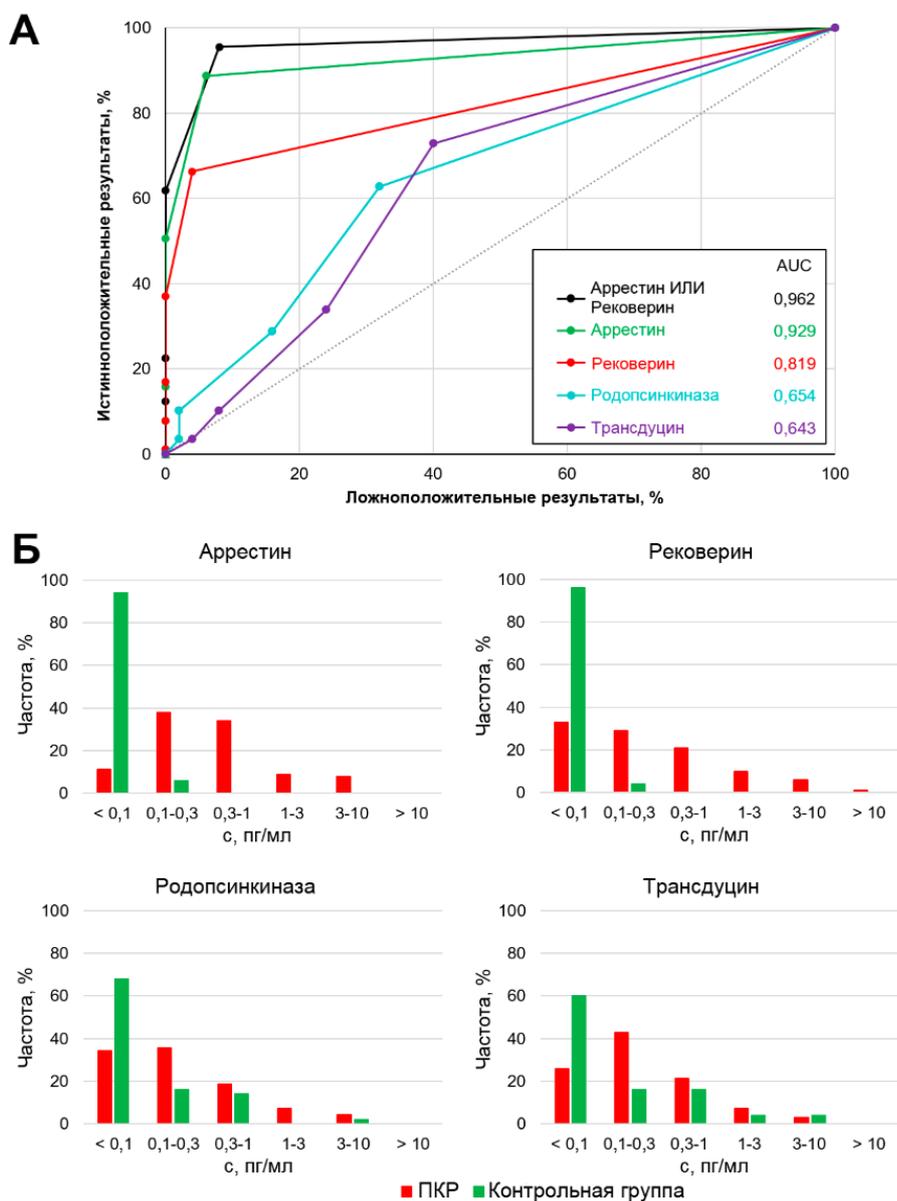


Рис. 72. (А) ROC-кривые для обнаружения в моче четырех отдельных антигенов (цветные линии) и комбинации аррестина и рековерина (черная линия). Размер выборки - 59 (для родопсинкиназы и трансдуцина) и 89 (для аррестина и рековерина) пациентов с ПКР и 50 человек из контрольной группы; (Б) Распределение концентраций антигенов в моче пациентов с ПКР (красный) и контрольной группы (зеленый). Значения χ^2 для различий между ПКР и контрольными

группами: $< 10^{-10}$ для аррестина и его комбинации с рековерином; 10^{-9} - для рековерина; 0,02 - для родопсинкиназы и 0,01 - для трансдуцина.

Таблица 18. Содержание раково-сетчаточных антигенов (пг/мл) в моче и сыворотке больных ПКР.

Пациент	Моча				Сыворотка крови			
	Аррестин	Рековерин	Родопсинкиназа	Трансдуцин	Аррестин	Рековерин	Родопсинкиназа	Трансдуцин
1	0,3-1	0,3-1	< 0,1	0,1-0,3	1-3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
2	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
3	0,1-0,3	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	3-10	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1
4	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3
5	3-10	< 0,1	0,1-0,3	0,3-1	1-3	< 0,1	0,1-0,3	0,3-1
6	0,3-1	0,3-1	0,3-1	0,3-1	< 0,1	0,3-1	0,1-0,3	0,3-1
7	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1	1-3	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3
8	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	< 0,1	0,3-1
9	3-10	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1	3-10	< 0,1	0,1-0,3	0,1-0,3
10	0,3-1	< 0,1	0,3-1	0,1-0,3	> 10	0,1-0,3	< 0,1	1-3
11	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3-10	< 0,1	< 0,1	< 0,1
12	3-10	0,3-1	0,3-1	0,3-1	0,3-1	3-10	< 0,1	0,1-0,3
13	1-3	3-10	1-3	1-3	> 10	0,3-1	< 0,1	< 0,1
14	0,1-0,3	1-3	0,1-0,3	0,1-0,3	1-3	< 0,1	0,3-1	0,3-1
15	0,3-1	> 10	1-3	3-10	1-3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3
16	0,3-1	< 0,1	0,3-1	0,1-0,3	1-3	< 0,1	0,3-1	< 0,1
17	0,1-0,3	0,3-1	0,1-0,3	< 0,1	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18	0,1-0,3	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
19	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	0,1-0,3	> 10	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3
20	< 0,1	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1
21	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	3-10	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1
22	1-3	1-3	0,3-1	0,3-1	3-10	< 0,1	< 0,1	< 0,1
23	0,3-1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
24	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	> 10	0,1-0,3	< 0,1	1-3
25	3-10	0,3-1	0,3-1	0,1-0,3	3-10	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1
26	0,3-1	< 0,1	0,1-0,3	0,3-1				
27	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1				
28	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3				
29	1-3	1-3	1-3	0,3-1				
30	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	1-3				
31	0,3-1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3				
32	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
33	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
34	0,3-1	1-3	1-3	0,3-1				
35	0,3-1	0,1-0,3	0,3-1	0,1-0,3				
36	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1	0,3-1				
37	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
38	0,3-1	< 0,1	0,1-0,3	0,1-0,3				
39	0,3-1	0,1-0,3	0,3-1	0,1-0,3				
40	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1				
41	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	1-3				
42	< 0,1	0,3-1	< 0,1	< 0,1				

43	0,3-1	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3				
44	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
45	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3				
46	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
47	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
48	3-10	3-10	3-10	1-3				
49	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3				
50	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
51	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
52	0,1-0,3	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3				
53	0,3-1	0,3-1	0,3-1	0,1-0,3				
54	0,3-1	0,3-1	< 0,1	< 0,1				
55	0,3-1	1-3	0,3-1	0,1-0,3				
56	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,3-1				
57	0,3-1	0,1-0,3	0,1-0,3	< 0,1				
58	1-3	3-10	3-10	3-10				
59	0,1-0,3	0,3-1	< 0,1	0,3-1				
60	< 0,1	0,1-0,3						
61	3-10	3-10						
62	1-3	1-3						
63	0,1-0,3	0,3-1						
64	0,1-0,3	< 0,1						
65	0,1-0,3	0,1-0,3						
66	0,1-0,3	< 0,1						
67	< 0,1	0,1-0,3						
68	0,1-0,3	< 0,1						
69	< 0,1	< 0,1						
70	0,1-0,3	0,1-0,3						
71	0,1-0,3	0,1-0,3						
72	1-3	1-3						
73	0,3-1	0,1-0,3						
74	0,1-0,3	< 0,1						
75	< 0,1	0,1-0,3						
76	0,3-1	0,1-0,3						
77	0,1-0,3	0,3-1						
78	0,3-1	1-3						
79	3-10	3-10						
80	0,3-1	0,3-1						
81	0,3-1	0,1-0,3						
82	1-3	0,1-0,3						
83	0,1-0,3	0,3-1						
84	0,3-1	3-10						
85	0,1-0,3	0,3-1						
86	0,1-0,3	< 0,1						
87	0,1-0,3	< 0,1						
88	0,3-1	0,3-1						
89	0,1-0,3	< 0,1						

Таблица 19 Содержание раково-сетчаточных антигенов (пг/мл) в контрольных образцах мочи и сыворотки крови.

Пациент	Моча				Сыворотка крови			
	Аррестин	Рековерин	Родопсинкиназа	Трансдуцин	Аррестин	Рековерин	Родопсинкиназа	Трансдуцин
1	< 0,1	0,1-0,3	0,3-1	0,3-1	1-3	0,1-0,3	< 0,1	1-3
2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3-10	< 0,1	< 0,1	< 0,1
3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3-10	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3
5	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,3-1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3
6	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
7	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,3-1	0,1-0,3
8	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3-10	3-10	0,3-1	3-10
9	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	> 10	< 0,1	< 0,1	< 0,1
10	< 0,1	< 0,1	0,3-1	1-3	> 10	< 0,1	0,1-0,3	0,1-0,3
11	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	1-3	< 0,1	< 0,1	1-3
12	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	> 10	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3
13	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1-3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
14	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	0,1-0,3	1-3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
15	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	1-3	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3
16	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,3-1				
17	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	0,3-1				
18	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
19	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
20	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
21	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
22	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3				
23	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
24	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,3-1				
25	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				

Недостаточное количество точек на кривых ROC связано с полуколичественным характером нашего анализа, при котором доступны только пять пороговых значений: 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 пг/мл, как обсуждалось выше. При пороге 0,1 пг/мл аррестин показал чувствительность 89% и специфичность 94%, а рековерин – 66% и 96% соответственно. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании комбинации аррестина с рековерином, когда тест считался положительным, если концентрация любого из этих биомаркеров превышала 0,1 пг/мл. В этом случае значение AUC составило 0,96 (95% ДИ 0,93–0,99), а значения чувствительности и специфичности достигли 96% и 92% соответственно, что является одним из лучших показателей среди всех опубликованных биомаркеров ПКР в сыворотке и моче. Можно также отметить значительные положительные попарные корреляции между концентрациями различных антигенов в моче пациентов с ПКР (табл. 20). Если предположить, что концентрация этих биомаркеров в моче определяется их aberrантной экспрессией в опухолевой ткани, то этот результат

закономерен, так как уровни экспрессии в группе близкородственных генов могут иметь положительную корреляцию.

Таблица 20. Коэффициенты корреляции логарифмов мочевых раково-сетчаточных антигенов. Доверительный уровень $p < 0,01$ ($N = 61$).

	Аррестин	Рековерин	Родопсинкиназа	Трансдуцин
Аррестин	1,000	0,372	0,593	0,480
Рековерин	0,372	1,000	0,693	0,587
Родопсинкиназа	0,593	0,693	1,000	0,678
Трансдуцин	0,480	0,587	0,678	1,000

Если раково-сетчаточные антигены, обнаруженные в моче, имеют опухолевое происхождение, то после удаления опухоли они должны исчезнуть. В группе ПКР мы отобрали 10 пациентов, у которых до операции были обнаружены антигены, и проанализировали образцы мочи, собранные через 7 дней после нефрэктомии. Результаты анализа представлены в табл. 21. Во всех случаях содержание аррестина и рековерина в моче было ниже предела обнаружения. Родопсинкиназа и трансдуцин были обнаружены в одном и двух образцах, что согласуется с их относительно низкими значениями специфичности. Таким образом, полученные данные подтверждают, что данные антигены имеют опухолевое происхождение и при удалении опухоли исчезают вместе с ней.

Таблица 21. Концентрация антигенов в моче больных до и через семь дней после удаления опухоли. Пациенты пронумерованы в соответствии с табл. 18.

Пациент #	Аррестин		Рековерин		Родопсинкиназа		Трансдуцин	
	До	После	До	После	До	После	До	После
2	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
6	0,3-1	< 0,1	0,3-1	< 0,1	0,3-1	< 0,1	0,3-1	< 0,1
9	3-10	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,3-1	< 0,1
12	3-10	< 0,1	0,3-1	< 0,1	0,3-1	< 0,1	0,3-1	< 0,1
15	0,3-1	< 0,1	> 10	< 0,1	1-3	< 0,1	3-10	< 0,1
29	1-3	< 0,1	1-3	< 0,1	1-3	0,1-0,3	0,3-1	< 0,1
40	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,3-1	0,3-1
41	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	1-3	< 0,1
52	0,1-0,3	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	0,3-1
72	1-3	< 0,1	1-3	< 0,1	–	–	–	–

Наконец, было исследовано, влияет ли на содержание аррестина и рековерина в моче конкретная форма и стадия опухоли. Существенных различий между группами светлоклеточного, хромофобного и папиллярного ПКР (рис. 73А) не было обнаружено, что позволяет предположить, что аберрантная экспрессия раково-сетчаточных антигенов является общей чертой различных опухолей. Стадия опухоли также не влияла на концентрации данных антигенов в моче (рис. 73Б).

Вполне вероятно, что не размер опухоли, а другие её характеристики, такие как способность эффективно промываться мочой, определяют высвобождение антигенов в мочу.

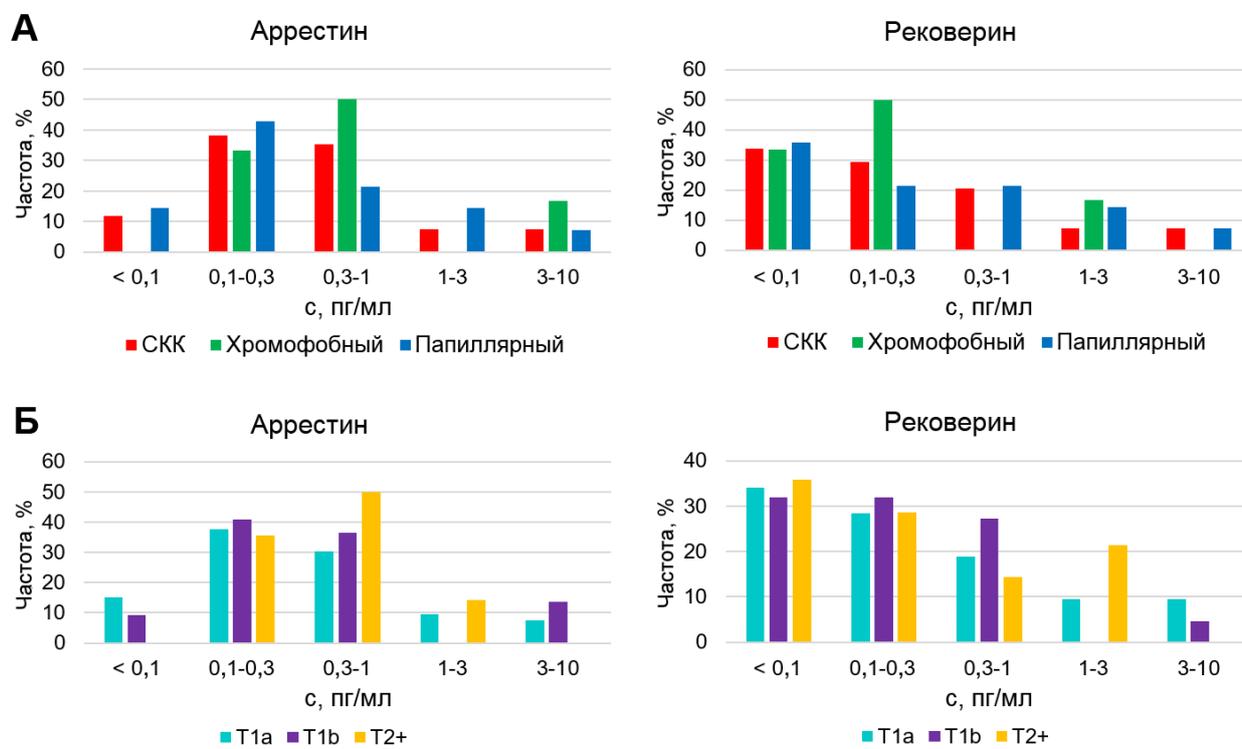


Рис. 73. (А) Распределение концентраций раково-сетчаточных антигенов в моче пациентов с различными формами ПКР: светло-клеточная карцинома (СКК, $N = 68$), хромофобный ПКР ($N = 6$), папиллярный ПКР ($N = 14$). (Б) Распределение концентраций раково-сетчаточных антигенов в моче пациентов в различными стадиями рака: T1a ($N = 53$), T1b ($N = 22$), T2-T4 ($N = 14$). Достоверных различий между разными формами ПКР или между разными стадиями опухоли не наблюдалось при уровне $p = 0,05$.

Очевидно, что открытие новых молекулярных маркеров для раннего выявления и прогнозирования ПКР по-прежнему остаётся сложной задачей для исследователей. В данной работе отмечается полезность жидкой биопсии для обнаружения продуктов опухолевых клеток, а именно раково-сетчаточных антигенов. Полученные данные свидетельствуют о том, что некоторые из них практически всегда экспрессируются при злокачественных опухолях почки. В то же время имеющиеся в литературе данные об экспрессии этих биомаркеров в других тканях злокачественных опухолей демонстрируют более низкую частоту встречаемости. При меланоме все раково-сетчаточные антигены выявлялись в ткани не более чем в 80% случаев как на белковом уровне (Вестерн-блоттинг), так и с помощью мРНК (RT-PCR) [287]. Экспрессия реоверина наблюдалась в 10–40% случаев рака лёгкого, желудка и толстой кишки [314, 315]. Экспрессия

аррестина и рековерина в опухолевых тканях больных ПКР составила 59% и 68% случаев соответственно [275, 284]. При этом аутоантитела к аррестину были обнаружены в сыворотке крови у 76% больных ПКР [275]. Это означает, что частота появления аутоантител к аррестину выше, чем самого аррестина, то есть аррестин экспрессируется в количествах, недостаточных для детекции с помощью иммуногистохимии, но достаточно больших, чтобы вызвать иммунный ответ. Таким же образом можно объяснить и наши результаты. Даже при крайне низких уровнях экспрессии биомаркеры вымываются из опухоли в мочу, а ультрачувствительный анализ способен их обнаружить, несмотря на то что в миллилитре содержится всего около миллиона молекул. Кроме того, мочевые биомаркеры определяются надежнее по сравнению с сывороткой, поскольку белки, попадающие в кровоток, более разбавлены и могут метаболизироваться быстрее. В настоящее время аквапорин-1 и перилипидин-2 отмечены как наиболее перспективные биомаркеры ПКР с чувствительностью и специфичностью 95% и 91% соответственно; в комбинации они показали 100% чувствительность и 95% специфичность [279]. Именно комбинация RKIP с его фосфорилированной формой продемонстрировала наибольшую диагностическую и прогностическую ценность при выявлении ПКР [281]. Показано, что САИХ в моче является биомаркером ПКР с чувствительностью 70% и специфичностью 100% по сравнению с пациентами с доброкачественными урологическими опухолями [316]. Однако, поскольку концентрации САИХ оказались слишком низкими у пациентов с ПКР, пришлось ввести предварительное концентрирование мочи и использовать более сложный метод Вестерн-блоттинга, что снизило потенциал широкого использования этого биомаркера. Уникальная высокая специфичность САИХ может быть использована в дальнейшем для улучшения эффективности анализа путём объединения его с другими потенциальными биомаркерами, демонстрирующими высокую чувствительность и низкую специфичность, в частности, при их детекции более чувствительными методами мультиплексного анализа. В целом, идея о том, что использование биомаркеров с разными характеристиками чувствительности и специфичности в одном анализе может улучшить диагностику рака, представляется весьма привлекательной и обоснованной [277]. В данной работе показано, что использование многокомпонентного микрочипа для одновременного определения аррестина и рековерина приводит к чрезвычайно высоким значениям чувствительности и специфичности. При этом после хирургического удаления злокачественной опухоли уровень этих антигенов в моче снижается до контрольного уровня. Таким образом, можно ожидать, что эти биомаркеры будут очень эффективны при последующем наблюдении пациентов после нефрэктомии или других инвазивных процедур. Следует обсудить проблему точности нашего анализа. Точность измерения концентрации составляла примерно половину десятичного порядка, что делает анализ полуколичественным. По этой причине мы не нормировали концентрацию

мочевых биомаркеров по креатинину. Можно заключить, что применение предложенного теста для качественного анализа является наиболее перспективным.

Наконец, для любого высокочувствительного теста, используемого для анализа образцов с большим избытком других белков, естественно возникает проблема специфичности. Несмотря на то что наш метод в целом демонстрирует хорошую специфичность, существуют некоторые проблемы. В частности, высокое содержание аррестина в контрольных образцах сыворотки крови, вероятно, обусловлено неспецифическими взаимодействиями, хотя нам и не удалось получить прямых доказательств. Проблемы со специфичностью могут возникать и по чисто физиологическим причинам. Показано, что данные антигены могут экспрессироваться в тканях и без злокачественных новообразований, как в случае онкоцитомы [275]. Антигены могут быть неспецифичны для ПКР, поскольку опухоли в других тканях, таких как мочевой пузырь или предстательная железа, также контактируют с мочой и могут высвобождать эти мочевые биомаркеры. Это является общей проблемой для широкого круга различных биомаркеров [277]. Поэтому необходимы исследования по определению уровня аррестина и рековерина в моче у больных с доброкачественными урологическими опухолями, а также с другими видами злокачественных новообразований. Предложенный метод, обладая высокой чувствительностью, имеет высокий диагностический и предиктивный потенциал: даже если при дальнейших исследованиях возникнут проблемы со специфичностью, наличие положительного результата теста даст первый сигнал для углубленного медицинского обследования. Многообещающей перспективой настоящей работы является также применение ультрачувствительного иммуноанализа для обнаружения других биомаркеров, имеющих более высокую специфичность.

4.3.4. Диагностическая эффективность раково-сетчаточных антигенов при раке мочевого пузыря и предстательной железы

Так как и при других формах урологических онкозаболеваний моча может контактировать со злокачественной опухолью, был проведено исследование образцов мочи больных РМП и РПЖ на содержание двух раково-сетчаточных антигенов - аррестина и рековерина. В данной части работы микрочипы включали активные зоны антител к аррестину и рековерину, а также зоны положительного контроля в двух повторах (рис. 74).

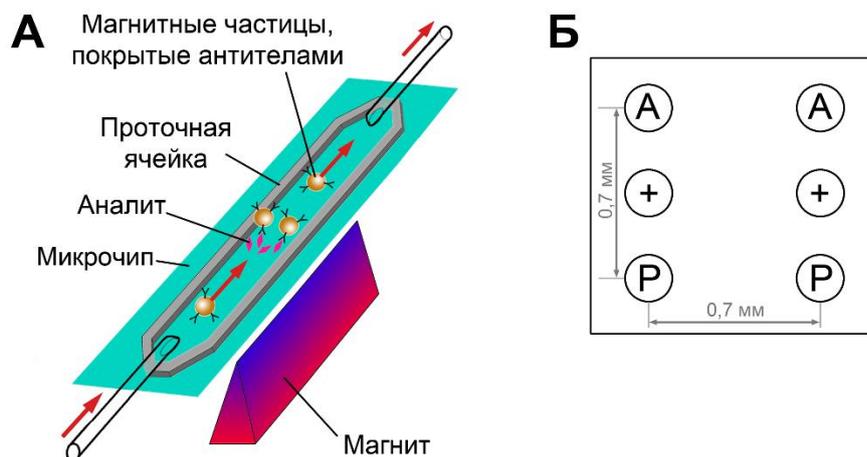


Рис. 74. А) Схема ультразвуковой детекции сигнала на микрочипе с помощью МЧ, покрытых специфическими антителами. Стрелки указывают траекторию движения магнитных частиц. Б) Схема микрочипа. Обозначения активных зон: А – моноклональные антитела к аррестину, Р – поликлональные антитела к рековерину, + – положительный контроль (рекомбинантный рековерин). Роль отрицательного контроля выполняет пространство между активными зонами микрочипа.

Всего в работе были проанализированы 40 образцов мочи больных РМП и 40 образцов больных РПЖ. На рис. 75 представлены репрезентативные фотографии микрочипов, полученные после проведения иммуноанализа.

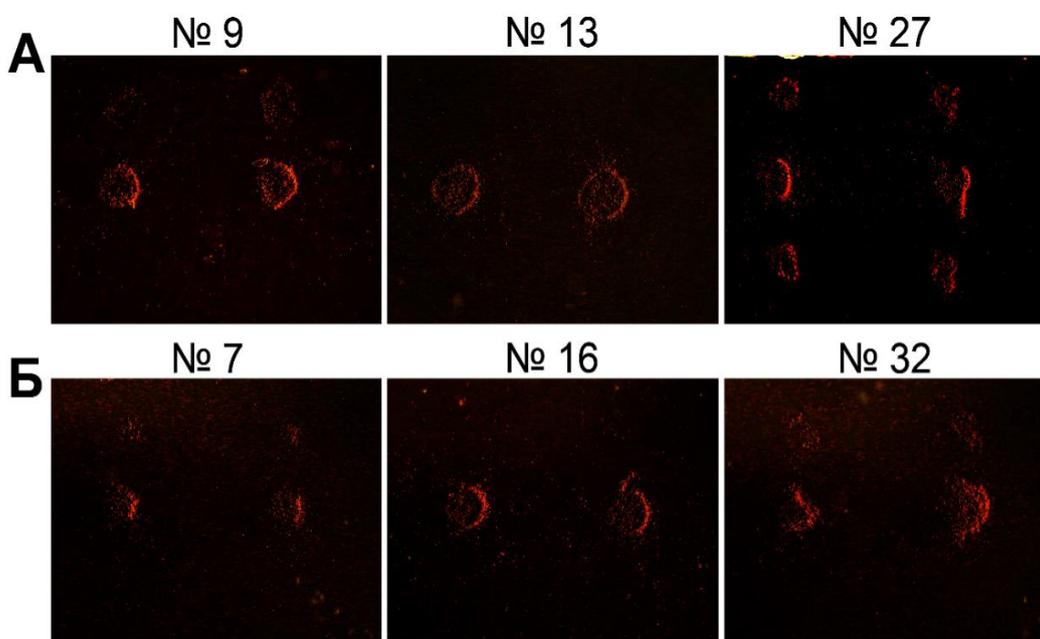


Рис. 75. Репрезентативные примеры результатов анализа образцов мочи, полученных от больных РМП (А) и РПЖ (Б). Номера образцов соответствуют табл. 24 и табл. 25.

На рис. 76 представлены ROC-кривые и соответствующие значения площади под кривой, AUC, для аррестина и рековерина по отдельности и их комбинации.

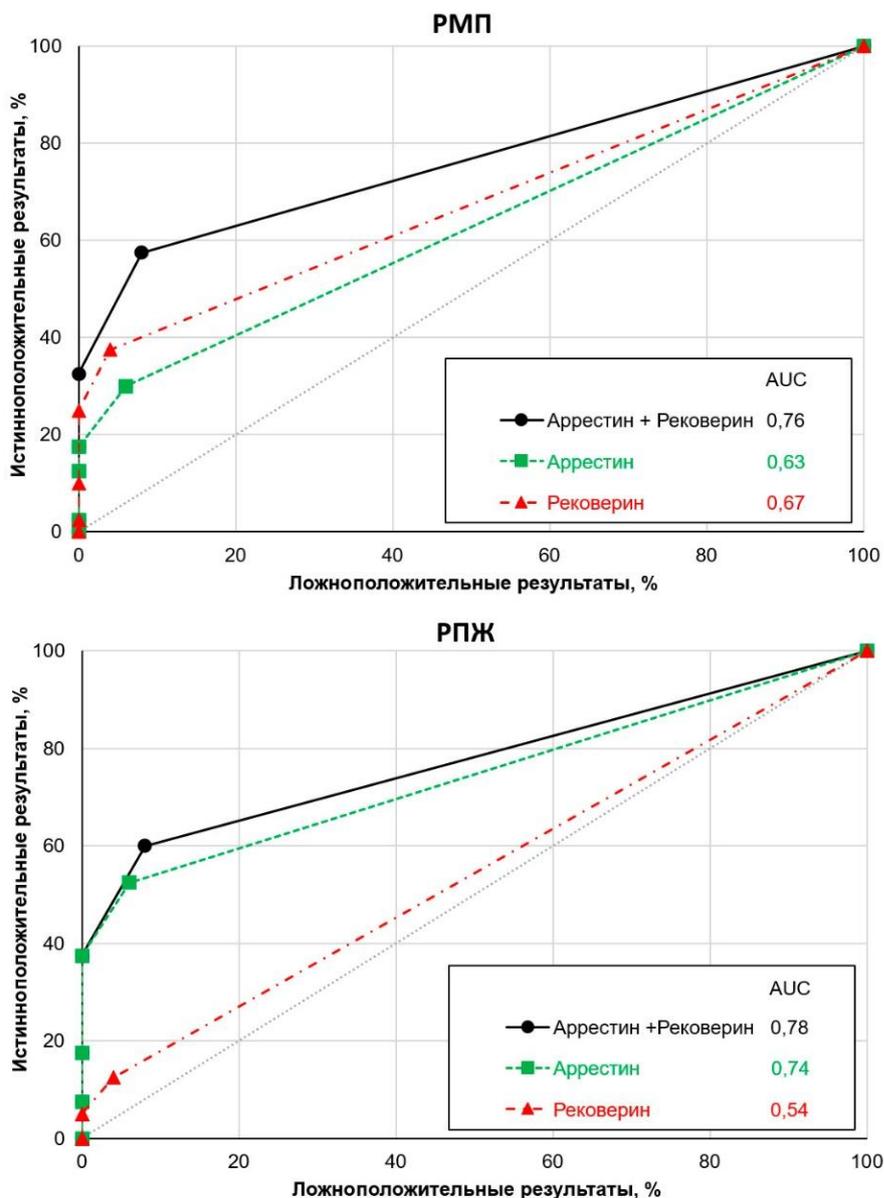


Рис. 76. ROC-кривые для диагностики РМП и РПЖ по аррестину, рековерину и их комбинации.

Как и в случае рака почки, полуколичественный характер используемого метода объясняется небольшим количеством доступных значений пороговой концентрации – 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 пг/мл. Очевидно, что оптимальным является минимальное значение пороговой концентрации 0,1 пг/мл. В табл. 22 указаны значения диагностической чувствительности и специфичности, отвечающие пороговой концентрации 0,1 пг/мл, а также доверительные интервалы для значений AUC. Исходные данные для вычисления приведены в табл. 23 и табл. 24.

Таблица 22. Характеристики эффективности диагностики урологических онкозаболеваний по аррестину, рековерину и их комбинации.

Биомаркер	Характеристика	ПКК	РМП	РПЖ
Аррестин	Чувствительность ¹	89% (N = 89)	30% (N = 40)	53% (N = 40)
	Специфичность ¹	94% (N = 50)		
	AUC ²	0,93 (0,89-0,97)	0,63 (0,51-0,75)	0,74 (0,63-0,85)
Рековерин	Чувствительность ¹	66% (N = 89)	38% (N = 40)	13% (N = 40)
	Специфичность ¹	96% (N = 50)		
	AUC	0,82 (0,75-0,89)	0,67 (0,55-0,79)	0,54 (0,42-0,66)
Комбинация аррестина с рековерином	Чувствительность ¹	96% (N = 89)	58% (N = 40)	60% (N = 40)
	Специфичность ¹	92% (N = 50)		
	AUC	0,96 (0,93-0,99)	0,76 (0,66-0,86)	0,78 (0,68-0,88)

¹Значения чувствительности и специфичности рассчитаны для пороговой концентрации 0,1 пг/мл.

²В скобках указаны значения 95% ДИ.

Таблица 23. Содержание аррестина и рековерина в образцах мочи больных РМП.

№ образца	Аррестин, пг/мл	Рековерин, пг/мл
1	< 0,1	0,1-0,3
2	< 0,1	0,1-0,3
3	< 0,1	0,1-0,3
4	0,1-0,3	< 0,1
5	0,3-1	< 0,1
6	< 0,1	0,3-1
7	0,1-0,3	< 0,1
8	0,1-0,3	< 0,1
9	0,1-0,3	< 0,1
10	< 0,1	1-3
11	< 0,1	< 0,1
12	< 0,1	< 0,1
13	< 0,1	< 0,1
14	< 0,1	< 0,1
15	< 0,1	< 0,1
16	< 0,1	< 0,1
17	< 0,1	< 0,1
18	< 0,1	< 0,1
19	< 0,1	< 0,1
20	< 0,1	0,3-1
21	< 0,1	< 0,1
22	0,1-0,3	< 0,1
23	< 0,1	0,1-0,3
24	< 0,1	< 0,1
25	1-3	0,3-1
26	< 0,1	< 0,1
27	3-10	3-10
28	1-3	< 0,1
29	< 0,1	1-3
30	< 0,1	< 0,1
31	< 0,1	< 0,1

32	< 0,1	< 0,1
33	< 0,1	0,3-1
34	1-3	0,3-1
35	< 0,1	< 0,1
36	< 0,1	< 0,1
37	< 0,1	0,3-1
38	0,3-1	< 0,1
39	1-3	1-3
40	< 0,1	0,1-0,3

Таблица 24. Содержание аррестина и рековерина в образцах мочи, а также ПСА в образцах сыворотки крови больных РПЖ.

№ образца	Аррестин, пг/мл	Рековерин, пг/мл	ПСА, нг/мл
1	3-10	1-3	11,90
2	1-3	< 0,1	14,60
3	0,3-1	< 0,1	9,11
4	0,1-0,3	< 0,1	11,40
5	0,1-0,3	< 0,1	5,19
6	< 0,1	0,1-0,3	5,17
7	0,1-0,3	< 0,1	25,04
8	< 0,1	0,1-0,3	4,80
9	1-3	< 0,1	39,50
10	0,3-1	< 0,1	15,00
11	1-3	< 0,1	5,42
12	0,3-1	< 0,1	10,30
13	0,1-0,3	< 0,1	4,50
14	< 0,1	< 0,1	9,00
15	< 0,1	0,1-0,3	4,50
16	< 0,1	< 0,1	5,23
17	< 0,1	< 0,1	3,50
18	< 0,1	< 0,1	7,72
19	0,3-1	< 0,1	24,90
20	1-3	< 0,1	17,00
21	0,3-1	< 0,1	24,00
22	3-10	< 0,1	5,40
23	< 0,1	< 0,1	10,00
24	< 0,1	< 0,1	6,05
25	3-10	1-3	5,24
26	< 0,1	< 0,1	6,64
27	0,3-1	< 0,1	5,45
28	0,3-1	< 0,1	7,08
29	< 0,1	< 0,1	5,51
30	0,1-0,3	< 0,1	6,50
31	< 0,1	< 0,1	8,90
32	0,3-1	< 0,1	8,92
33	< 0,1	< 0,1	5,62
34	< 0,1	< 0,1	7,50

35	< 0,1	< 0,1	10,00
36	< 0,1	< 0,1	5,58
37	< 0,1	< 0,1	5,60
38	< 0,1	< 0,1	11,35
39	< 0,1	< 0,1	16,00
40	0,1-0,3	< 0,1	9,28

Для сравнения в табл. 22 также приведены данные по диагностической чувствительности определения ПКР, а также оценка специфичности аррестина, рековерина и их комбинации, полученная на основании результатов анализа образцов пациентов, не имеющих злокачественных опухолей. Важно отметить, что контрольная группа из 50 человек не включала пациентов с доброкачественными опухолями почки и мочевого пузыря, однако в группе из 13 больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы у двоих был детектирован аррестин. При этом доля положительных анализов оказалась существенно ниже ($2/13 = 15\%$), чем в случае РПЖ (60%), но больше, чем в контрольной группе ($(4-2)/(50-13) = 5\%$). Как уже упоминалось, аррестин и рековерин могут экспрессироваться и в доброкачественных опухолях [275], поэтому изучение возможности дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей по данным антигенам в моче является самостоятельной задачей.

Из полученных данных следует, что в случае РМП лучшей предсказательной способностью обладает комбинация биомаркеров: значение AUC повышается с 0,63 для аррестина и 0,67 для рековерина до 0,76 (рис. 76). В то же время предсказательная сила рековерина для диагностики РПЖ близка к нулю (AUC = 0,54). Как следствие, эффективность его комбинации с аррестином остается на уровне самого аррестина (AUC = 0,78 и 0,74 соответственно). Для объяснения этих результатов требуется детальное понимание механизмов, управляющих aberrантной экспрессией раково-сетчаточных антигенов различными типами раковых клеток, однако пока они остаются невыясненными. Чувствительность комбинации аррестина с рековерином составляет около 60% как для РМП, так и для РПЖ (в обоих случаях по сравнению с данными из контрольной группы $p < 0,001$ в χ^2 -тесте). Таким образом, эффективность диагностики РПЖ нашим методом находится в том же интервале значений, что и традиционный ПСА-тест, основанный на анализе крови. К преимуществам метода можно отнести простоту получения образцов, использование недорогого оборудования. В общем, при урологических онкозаболеваниях концентрация выделяемых опухолью белковых биомаркеров в моче существенно выше по сравнению с кровью, что, в сочетании с более низким содержанием белков в моче, может способствовать более высокой диагностической эффективности мочевых биомаркеров.

Была также исследована корреляция содержания ПСА в сыворотке крови и аррестина с рековерином в моче у больных РПЖ. Для этого использовали сыворотку пациентов, имеющих положительный и отрицательный анализ мочи на аррестин и рековерин (рис. 77). Показано, что

для больных, в моче которых были определены эти антигены, характерен более высокий уровень ПСА, хотя различие не является статистически значимым ($p > 0,05$). Кроме того, высокие уровни ПСА ($> 10-15$ нг/мл) также более характерны для пациентов, имеющих положительный тест на аррестин или рековерин, поэтому нельзя исключить наличие зависимости между уровнем ПСА и содержанием раково-сетчаточных антигенов в моче у больных РПЖ.

Для исследования предиктивных свойств аррестина и рековерина были проанализированы образцы мочи, взятые через 7 дней после удаления опухоли у больных с РМП и РПЖ, у которых тест до операции был положительным. Результаты анализа приведены в табл. 25 и табл. 26. После удаления опухоли у больных с РМП и РПЖ антигены не детектируются в 90% случаев. Таким образом, по предсказательной способности раково-сетчаточные антигены выгодно отличаются от многих других биомаркеров, в частности, ПСА, концентрация которого может оставаться довольно высокой и после удаления предстательной железы. Это может иметь большое практическое значение, например, для отслеживания эффективности лечения.

Таблица 25. Результаты анализа образцов мочи, полученных от больных РМП перед операцией и через 7 дней после операции. Номера образцов соответствуют табл. 23 и табл. 24.

Пациент	Аррестин, пг/мл		Рековерин, пг/мл	
	До операции	После операции	До операции	После операции
1	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
2	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
3	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
4	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
5	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
6	< 0,1	< 0,1	0,3-1	< 0,1
7	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
8	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
9	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
10	< 0,1	0,3-1	1-3	< 0,1

Таблица 26. Результаты анализа образцов мочи, полученных от больных РПЖ перед операцией и через 7 дней после операции. Номера образцов соответствуют табл. 23 и табл. 24.

Пациент #	Аррестин, пг/мл		Рековерин, пг/мл	
	До операции	После операции	До операции	После операции
1	3-10	< 0,1	1-3	< 0,1
2	1-3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
3	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
4	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
5	0,1-0,3	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1

6	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
7	0,1-0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
8	< 0,1	< 0,1	0,1-0,3	< 0,1
9	1-3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
10	0,3-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

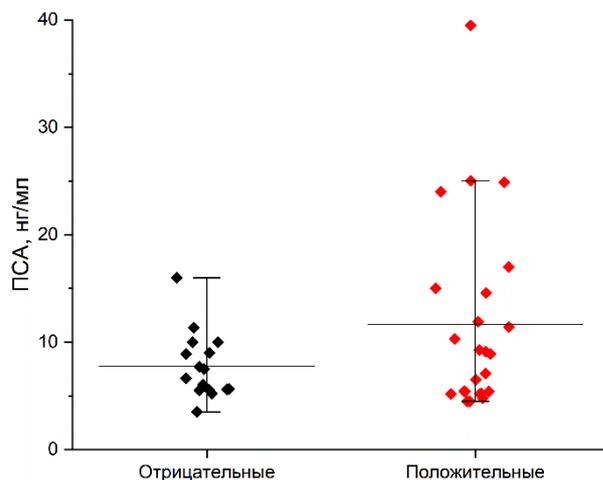


Рис. 77. Сравнение содержания ПСА в образцах сыворотки пациентов с положительным и отрицательным анализом мочи на аррестин и рековерин. Приведены медианы и 5% - 95% перцентили.

4.3.5. Выводы к разделу 4.3.

При различных урологических онкозаболеваниях в мочу могут выделяться раково-сетчаточные антигены аррестин и рековерин в концентрациях порядка 0.1-1 пг/мл, которые нельзя определить традиционными методами иммуноанализа, такими как ИФА, Вестерн-блот или иммунохроматография. Для детекции антигенов использовали «активный» иммуноанализ на микрочипах без применения специального дорогостоящего оборудования. Однако диагностическая чувствительность комбинации аррестина с рековерином в случае РМП и РПЖ оказалась существенно ниже, чем в случае ПКР: анализ позволяет выявлять РМП и РПЖ с чувствительностью 58-60%, в то время как для ПКР она составляет 96%. Это может объясняться особенностями морфологии опухоли, приводящими к различной эффективности экстракции aberrантно экспрессируемых антигенов из опухолевой ткани в мочу. В случае положительного теста пациенту потребуется дополнительное обследование для дифференциальной диагностики этих урологических онкозаболеваний. С высокой вероятностью изучаемые раково-сетчаточные антигены не будут обнаруживаться при раке других органов, так как даже в случае прямого контакта мочи с опухолью концентрации антигенов оказываются на пределе обнаружения. Полученные результаты по послеоперационной динамике аррестина и рековерина в моче показывают, что они могут рассматриваться как потенциальные предиктивные биомаркеры при

лечении и для оценки состояния больных, а также для доклинического выявления рецидивов заболевания.

ГЛАВА 5. НОВЫЕ ФОРМАТЫ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БЕЛКОВ С ИХ ПРИМЕНЕНИЕМ В УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНОМ ИММУНОАНАЛИЗЕ

5.1. Проточная ячейка для электрофоретического сбора аналита на магнитных частицах

Применение магнитных меток в иммуноанализе на микрочипах обеспечивает дополнительную возможность: молекулы аналита можно собирать не только на поверхности микрочипа, но и на поверхности частиц путём смешивания образца с суспензией МЧ. Достоинством такого варианта анализа является простота технической реализации, что может быть полезно, например, при использовании в автоматических иммунохимических анализаторах. Однако в этом случае возникает проблема эффективного сбора аналита на магнитных частицах. Чтобы обеспечить низкое значение PrO , в анализе имеет смысл использовать как можно меньше магнитных меток, чтобы количество молекул аналита, приходящееся на одну частицу, было максимальным. Но при этом среднее расстояние между частицами в суспензии увеличивается, что делает неэффективным диффузионно-контролируемое связывание аналита на их поверхности. Для решения этой задачи и было сконструировано устройство, которое позволяет с высокой эффективностью проводить сбор аналита на поверхности МЧ.

Предлагаемое устройство может быть эффективно использовано для индикации аналитов в иммунобиологической пробе, содержащей белки, пептиды, ДНК, вирусы, клетки, клеточные мембраны, для предконцентрирования проб при проведении анализа в автоматическом режиме. Исходно устройство разрабатывалось для автоматического анализатора в рамках выполнения Сколковского проекта Инноград-Пушино. Патентоведческая экспертиза выявила несколько близких к предлагаемому подходу методов. Описан способ диагностики аналита в пробах, основанный на системе магнитного распознавания [317]. В этом случае в анализе используется присоединённая к намагничиваемому веществу метка, которая включает распознающую аналит часть и фрагмент для связывания намагничиваемого вещества, - металлсвязывающего белка, полипептида или пептида. При этом возможность концентрирования аналита отсутствует. Предложено устройство для высокочувствительной магнитной детекции биологических макромолекул [318], основанной на связывании рецепторов и лигандов, которая осуществляется с помощью двух приспособлений - одного для создания магнитного поля, второго – детекторного – для измерения магнитных свойств пробы. В данном методе магнитные частицы не используются, и ускоренный сбор аналита в измеряемой пробе отсутствует. Описан мультиплексный иммуноанализ с помощью микрочастиц [319], в котором используется смесь различных

микрочастиц, покрытых биоспецифическими реагентами для связывания искомым анализом и меченных одним или несколькими флуорофорами в различных концентрациях. Детекция происходит на основании разницы соотношений концентраций флуорофоров в микрочастицах, отличающихся у разных анализируемых веществ. Этот подход также не предусматривает концентрирования анализом и, следовательно, не позволяет получить выигрыш по времени анализа. Наиболее близкими к разработанному подходу являются методы, описанные в [320, 321]. В этих работах для анализа биологических проб используют иммобилизованные на микрочипах определённые пробные молекулы. Реакция между реагентом, иммобилизованным на поверхности, и анализом протекает в условиях диффузионных ограничений, что не позволяет сократить время анализа.

Понятно, что время сбора анализом на частицах можно существенно уменьшить, сконцентрировав как раствор анализом, так и суспензию частиц. Одним из традиционных способов ускорения сорбции анализом является интенсивное перемешивание, которое способствует уменьшению толщины неперемешиваемого слоя вокруг частиц. Такой вариант реализуется, например, в потоке анализируемого раствора при пропускании через хроматографическую колонку. Однако в этом случае возможность концентрирования самого анализом отсутствует. Анализ следовых количеств различных веществ, таких как токсины и вирусы, сталкивается с рядом физических ограничений. Во-первых, скорость реакции из-за низкой концентрации анализом так мала, что для его связывания требуются многие часы. Во-вторых, сродство пробной молекулы с искомым веществом (специфичным антителом или комплементарной последовательностью нуклеотидов) определяется константой диссоциации. Молекулы иммуноглобулинов имеют константу диссоциации порядка 10^{-9} - 10^{-11} , что ограничивает определение концентраций анализом традиционными методами на уровне 10 пг/мл. Учитывая, что многие биотоксины действуют в существенно меньших концентрациях, данное обстоятельство серьёзно затрудняет использование стандартных методов для их анализа.

5.1.1. Конструкция электрофоретической ячейки с магнитным концентратором

Основным элементом устройства является жёлоб (2), образуемый двумя диализными мембранами (рис. 78), в котором происходит электрофоретическое концентрирование анализом и осуществляется сбор с помощью магнитных частиц. Проточная ячейка состоит из каналов (1) с электродами (3), которые создают электрическое поле, перпендикулярное потоку жидкости. В нижний канал (1) помещён магнитный концентратор (5) с острым наконечником, создающим высокий градиент магнитного поля. Движение МЧ вдоль жёлоба осуществляется под действием вязкой силы со стороны потока жидкости в непрерывном режиме. Далее МЧ со связанным

аналитом из жёлоба попадают в проточную ячейку с микрочипом, описанную ранее (на рис. не показана).

Удаление магнитных частиц из жёлоба может производиться в непрерывном режиме потоком жидкости, подбирая его скорость и величину магнитного поля. В другом режиме магнитное поле можно периодически выключать путём удаления магнита (4) или используя электромагнит.

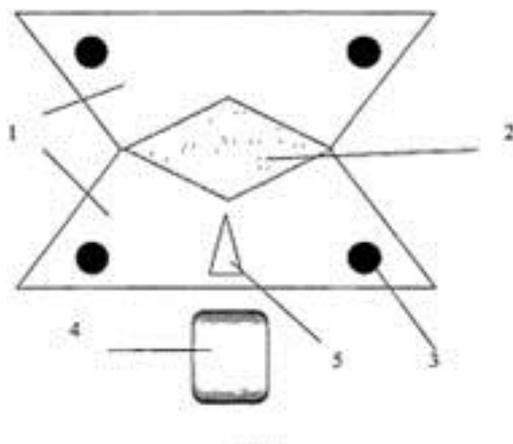


Рис. 78. Схематическое изображение сечения проточной камеры для сбора аналита на магнитных частицах. 1 - электродные каналы, 2 - жёлоб из полупроницаемой мембраны; 3 - электроды; 4 - магнит; 5 - концентратор магнитного поля.

5.1.2. Определение предела обнаружения стафилококкового токсина А в тест-системе с электрофоретическим сбором на магнитных частицах

Работоспособность метода была подтверждена обнаружением следовых количеств стафилококкового энтеротоксина SEА. Для этого использовали магнитные частицы, содержащие на поверхности моноклональные антитела против этого токсина. Такие частицы получали реакцией коммерческих стрептавидин-содержащих магнитных частиц с биотинилированными моноклональными антителами. Так как метод содержит стадию электроконцентрирования аналита, в экспериментах использовали низкопроводящий буферный раствор, содержащий 10 мМ имидазола, 20 мМ глицина, 1% ПВП, 1% ПВС, рН 8,5. Перед входом в жёлоб помещали тройник, в котором происходило смешивание суспензии магнитных меток, покрытых моноклональными антителами к SEА, и анализируемого образца. Смесь пропускали через жёлоб со скоростью 10 - 30 мкл/мин при напряжении 100 В; для его охлаждения через каналы прокачивали буферный раствор со скоростью 6 мл / мин. Затем смесь поступала в проточную ячейку, описанную ранее. Магнитные частицы сканировали поверхность микрочипа, на котором были иммобилизованы специфические антитела к SEА, при приложении магнитного поля. Регистрацию связавшихся в

активных зонах МЧ проводили с помощью микроскопа, оборудованного темнопольным осветителем и цифровой фотокамерой.

Показано, что в образце объёмом 100 мкл, используя 3×10^4 частиц, можно детектировать 10 фг энтеротоксина (или 2×10^5 молекул), что соответствует концентрации 3 фМ. В отсутствие электрофоретического сбора аналита на частицах при типичной для моноклональных антител константе диссоциации комплекса антиген-антитело $K_d = 10^{-9}$ М, доля связавших токсин молекул антител на поверхности МЧ составила бы всего $3 \times 10^{-15} / 10^{-9} = 3 \times 10^{-6}$. Этого недостаточно для их детекции, так как в этом случае основная часть частиц не содержит ни одной связанной молекулы аналита. Электрофоретическое концентрирование способно увеличить локальную концентрацию анализируемого вещества в 10^4 раз. При этом доля антител, связавших аналит, возрастает до $\sim 3\%$, что позволяет надёжно детектировать сигнал.

Еще одно преимущество устройства заключается в значительном ускорении связывания аналита. Так, при использованной в примере концентрации суспензии МЧ среднее расстояние между частицами составляет $a \sim 150$ мкм. Без применения активных методов анализа молекулам белка ($D \sim 5.5$ мкм²/с) для связывания требуется время $t = (a/2)^2 / 2D = 8$ мин. В предлагаемом устройстве только за счёт увеличения концентрации энтеротоксина в 10^4 раз время уменьшается до 50 мс. Высокой эффективности связывания также способствует повышенная концентрация частиц, вызванная действием магнитного поля. В описываемом способе за счёт увеличения локальных концентраций аналита и магнитных меток ПрО значительно снижается, а время анализа сокращается до нескольких минут.

5.2. Конический электрофоретический концентратор для заряженных биомолекул

Прекоцентрирование является стандартной процедурой при анализе сильно разбавленных образцах, таких как конденсат выдыхаемого воздуха [322] и питьевая вода [323]. Для концентрирования разбавленных растворов белков и ДНК было предложено несколько технологий: методы ультрафильтрации, используемые в коммерческих устройствах от Millipore и других компаний [324], удаление воды путём сушки в диализном мешке [325], а также добавление сухого сефадекса или других сухих гидрофильных гелей к белковому раствору [326-328]. Последний пример прост в применении, но сопровождается потерей части белка из-за адсорбции на большой поверхности частиц геля. К тому же он не может обеспечить высокую степень концентрирования - коэффициент концентрирования редко превышает один порядок.

Устройства на основе электрофореза стоят значительно выше по уровню концентрирования для заряженных макромолекулярных аналитов. Первый простой дизайн электрофоретического концентратора для белков, состоящий из стеклянной трубки, снабжённой с одного конца диализной мембраной, описан Чинном с соавт. [329]. Позже на

основе той же идеи было предложено несколько конструкций [43, 330-332]. Разработка микроканальных технологий сделала идею электрофоретического концентрирования особенно привлекательной для повышения чувствительности анализа. Описаны несколько микроэлектрофоретических устройств с использованием ультрафильтрационных мембран или барьеров, изготовленных из полупроницаемых гелей [333-336], в которых используется высокоэффективная передача тепла в микроканалах и, следовательно, они не предназначены для образцов объёмом больше, чем несколько микролитров. Родос и Ифантис предложили более эффективный вариант метода [337] путём введения воронкообразной приёмной полости в концентрированный полиакриламидный гель, служащий пробкой. Хотя эта конструкция имеет определённые преимущества перед плоским гелем и мембраной, она имеет несколько ограничений: в этом случае должны применяться особые концентрирующие гели с низкой проницаемостью для белковых молекул и низкие значения электрического поля (10-15 В/см) во избежание перегрева, что приводит к увеличению времени концентрирования до нескольких часов.

В настоящей работе предложен электрофоретический метод, лишённый указанных недостатков. Экстремально сильное концентрирование белковых макромолекул за 10-15 мин достигается за счёт использования конического концентратора - камеры из диализной мембраны, в которой площадь электрического контакта изменяется в ходе процесса. Метод может быть использован для ультраразбавленных биологических образцов, которые не могут быть проанализированы без существенного предварительного концентрирования. Сбор концентрированных белков из ультрамалых объёмов жидкости производится с помощью химически активированных магнитных частиц. Связавшиеся с ними белковые анализы могут быть сразу идентифицированы по их взаимодействию со специфическими антителами.

5.2.1. Распределение электростатического потенциала в конической электрофоретической ячейке

Для высокоэффективного концентрирования белков была предложена принципиально новая система, основным элементом которой является конусообразная ячейка из диализной мембраны (рис. 79). Для исследования распределения электрического поля внутри ячейки использовали измерительный электрод, который погружали на разную глубину буферного раствора при включённом напряжении. В процессе погружения электрода регистрировали зависимость электрического напряжения от глубины, по которой затем рассчитывали значения напряжённости. На рис. 80 показано, что при понижении уровня электродного буфера во внешнем сосуде максимум напряжённости электрического поля растёт и становится более узким, движется вниз, увлекая за собой заряженные макромолекулы.

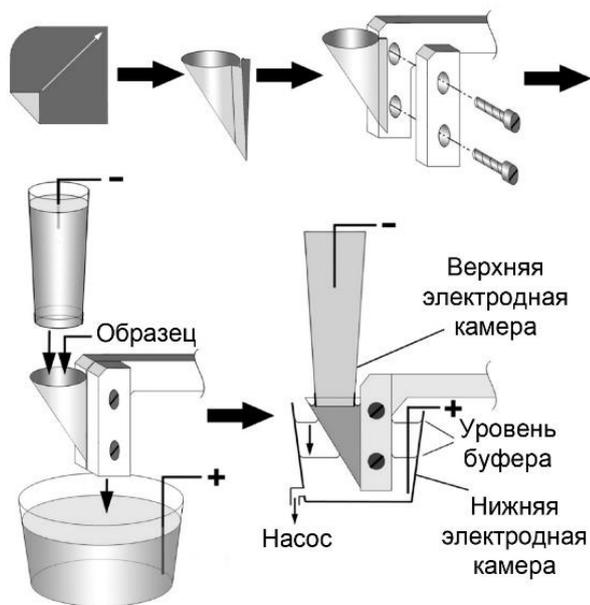


Рис. 79. Конструкция устройства для концентрирования биомакромолекул. Коническая ячейка формируется из листа диализной мембраны, зажимается в держателе и помещается в камеру для электрофореза. В ячейку загружают образец, включают напряжение и откачивают раствор из нижней камеры с помощью насоса.

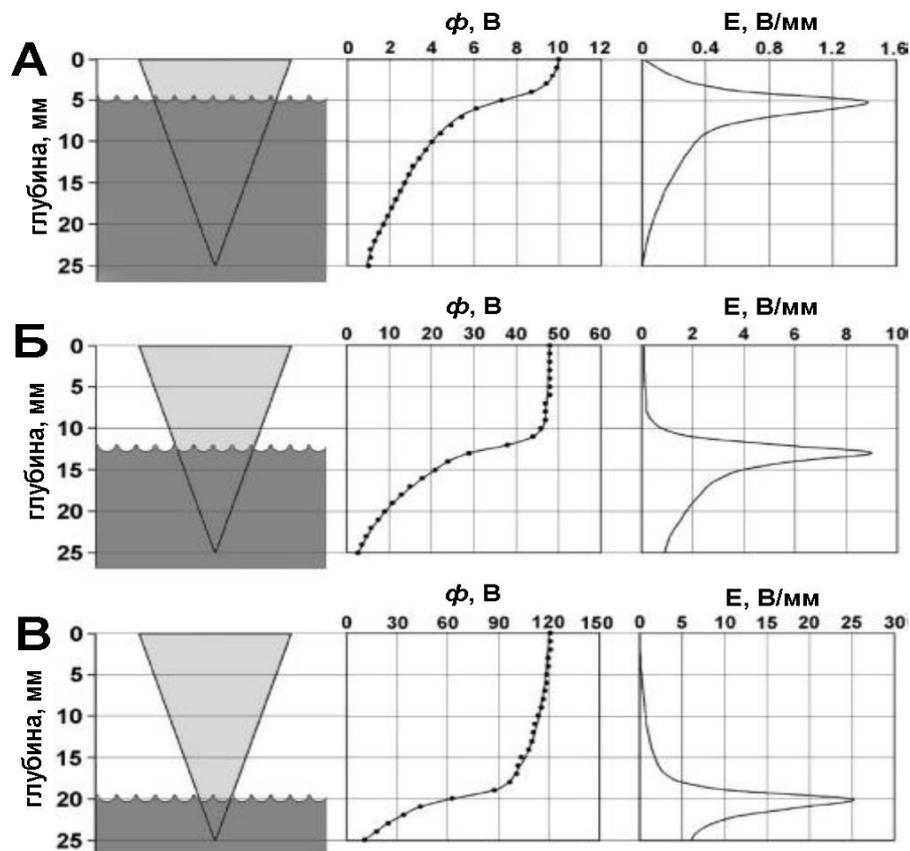


Рис. 80. Распределение электрического поля внутри конической ячейки во время электрофореза с разным уровнем буфера в нижней электродной камере. Глубина погружения измерительного электрода: (А) 5.0, (Б) 12.5 и (В) 20.0 мм. Напряжённость электрического поля (E) определяли дифференцированием сглаженных зависимостей потенциала φ от глубины, приведённых на средних панелях. Напряжение - 200 В.

Таким образом, электрофоретическое концентрирование в конической ячейке объединяет преимущества свободного электрофореза (большой выбор буферов) и изотахофореза (перемещение максимума электрического поля с захватом заряженных макромолекул).

Хотя небольшие изменения напряжения были замечены при перемещении зондирующего микроэлектрода перпендикулярно конусу, ось компоненты поля была много меньше вертикальной составляющей на тех же высотах; а именно, горизонтальная компонента поля на уровне контакта с нижним буфером, измеренная от основания конуса на расстоянии 5,0, 12,5 и 20,0 мм, не превышала 0,1, 0,5 и 2 В/мм соответственно. Следует упомянуть о нескольких важных преимуществах этой методики. Во-первых, может быть достигнут очень высокая степень концентрирования благодаря более высокой диссипации тепла из более узкой части конуса на финальном этапе. Как следствие, может быть применено более сильное электрическое поле. Во-вторых, та часть мембраны, на которой протекает электрофорез, погружена в охлаждённый буфер нижнего электрода, обеспечивая эффективное рассеивание тепла. Таким образом, в процессе концентрирования молекулы белка не подвергаются перегреву. В-третьих, в отличие от плоской диализной мембраны, с которой концентрированный белок не может быть эффективно собран, конус обеспечивает экстремальную локализацию концентрированного образца, так что даже субмикролитровые объёмы могут быть легко отобраны. Наконец, при электрофорезе более тёплые верхние слои раствора в конусе дополнительно работают против конвекции, поэтому не требуется дополнительной стабилизации градиента температуры.

Для визуального наблюдения за концентрированием белка был выбран модельный белок ФИТЦ-БСА благодаря интенсивной окраске, а также простой количественной оценки эффективности сбора методом флуоресценции. Белок при рН 8,5 заряжен отрицательно и при приложении положительного потенциала к нижнему электроду собирается в вершине конуса. Постепенно на уровне контакта с поверхностью нижнего буфера появляется желтый цвет, и его интенсивность увеличивается при понижении уровня буфера. На рис. 81А представлен общий вид собранного электрофоретического устройства.

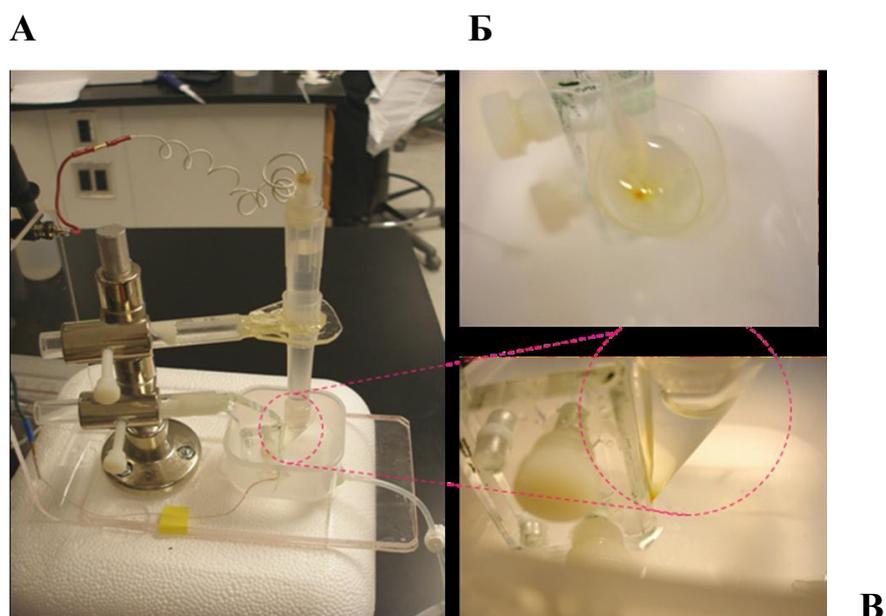


Рис. 81. (А) Общий вид конического устройства для электроконцентрирования без верхней электродной камеры. Вид сверху (Б) и сбоку (В) на конус после электрофоретического концентрирования ФИТЦ-БСА.

В процессе концентрирования вершина конического концентратора приобретает ярко-жёлтого окраску, что указывает на высокую концентрацию собранного белка (рис. 81Б). Простые оценки, основанные на размере цветной зоны ФИТЦ-БСА (высотой 0,5 мм и углом полуконуса 15°), показывают, что её объём составляет ~ 14 нл. Это означает, что уровень концентрирования ФИТЦ-БСА достигает 100000 без существенной потери белка, а его концентрация в этой области должна достигать ~ 100 мг/мл. Нельзя исключить, что при такой высокой концентрации может происходить некоторая агрегация и осаждение белка. Для ФИТЦ-БСА этот процесс, вероятно, обратим, поскольку в аликвотах, взятых для измерения флуоресценции, не было замечено нерастворимого материала. Стоит отметить, что размер цветной зоны после отключения напряжения довольно быстро расширяется. Для оценки коэффициента диффузии ФИТЦ-БСА 1 мкг белка концентрировали в пиридин-боратном буфере. Сразу после выключения напряжения была сделана серия фотографий вершины конуса, которая представлена на рис. 82. Изображения анализировали с использованием программного обеспечения Photoshop 7.0 (Adobe). Фиксированный уровень области серого цвета выбирали в качестве порога и измеряли изменение расстояния между вершиной конуса и положением порогового уровня для каждого изображения в синем канале RGB (синий цвет дополняет желтый цвет ФИТЦ-БСА).

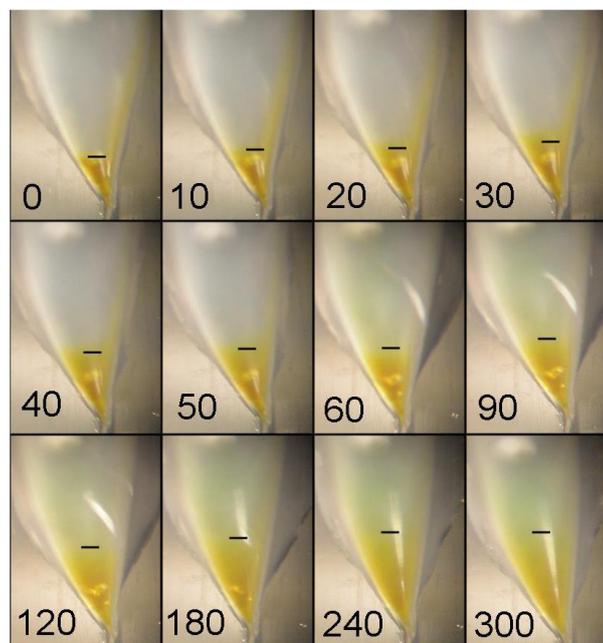


Рис. 82. Расширение концентрированного белкового слоя после отключения напряжения. Число на кадре обозначает время в секундах, прошедшее после выключения электрического поля. Пороговая линия для цветной зоны обозначена на каждом изображении черной чертой.

На рис. 83А представлена зависимость изменения размера слоя ФИТЦ-БСА от корня квадратного из времени.

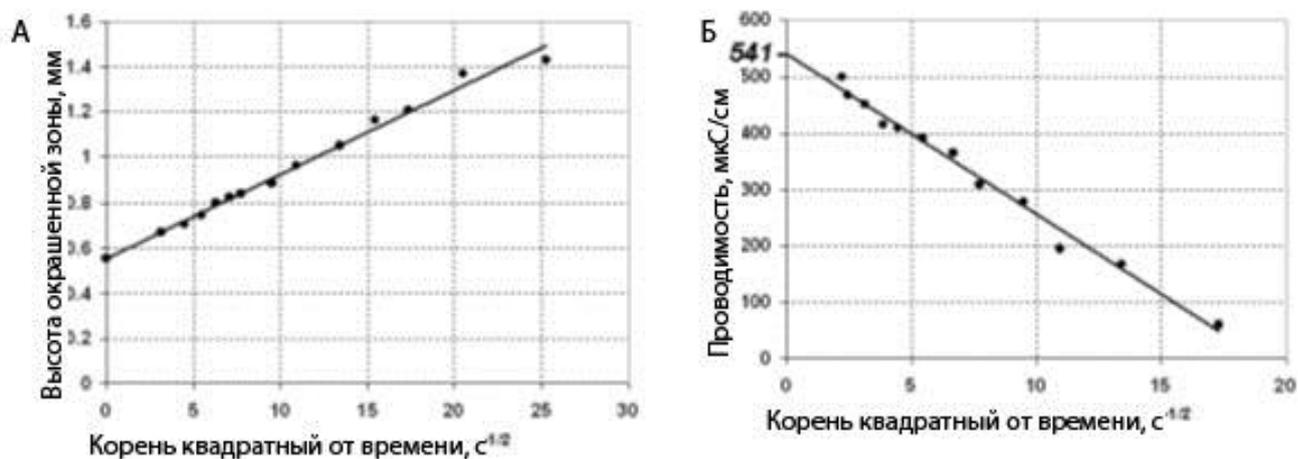


Рис. 83. (А) Оценка коэффициента диффузии ФИТЦ-БСА по данным рис. 82. Наклон линейной регрессии даёт значение коэффициента диффузии $1,4 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. (Б) Уменьшение электропроводности пиридин-боратного буфера в вершине конуса после выключения напряжения. Экстраполированное значение электропроводности сразу после выключения электрического поля отмечено на вертикальной оси.

Линейный характер графика указывает на то, что расширение белкового слоя следует закону диффузии. Однако рассчитанный коэффициент диффузии $D = 1,4 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ значительно превышает коэффициент диффузии молекул ФИТЦ-БСА в воде, равный $6,8 \times 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ [338]. Полученное значение ближе к коэффициенту диффузии аниона борной кислоты, $D = 9,8 \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$ [339], который является основным анионом в используемом пиридин-боратном буфере. Можно предположить, что в наших экспериментальных условиях молекулы белка следуют за расширением поляризационного слоя, состоящего в основном из ионов бората и пиридиния.

5.2.2. Электрохимические эффекты, связанные с поляризацией мембраны

Мембранная поляризация играет важную роль в подавлении конвекции в конусе. Хотя диализная мембрана обычно считается электрически нейтральной, она включает $\sim 10 \text{ мМ}$ кислотных групп [43], что делает ее мягким катионообменником. При положительном потенциале на нижнем электроде отрицательные ионы собираются в конусе из-за низкой проницаемости через отрицательно заряженную мембрану. Некоторое количество катионов накапливается для обеспечения электронейтральности, формируя таким образом слой соли с более высоким значением электропроводности и уменьшая локальное электрическое поле. Рис. 83Б показывает, что проводимость раствора в процессе концентрирования вблизи вершины конуса возрастает более чем в 10 раз по сравнению с буфером. Аналогичные зависимости получаются для буферного и разбавленных белковых растворов.

Попытки сконцентрировать цитохром с (Cyt c) (pI 10) в изготовленном конусе из исходной диализной мембраны в имидазол-глициновом или в пиридин-боратном буфере с отрицательным напряжением, приложенным к нижнему электроду, оказались безуспешными: сначала цветная зона появлялась, но вскоре исчезала. Вероятно, это связано с поляризацией мембраны, имеющей небольшой отрицательный заряд. В ходе электрофореза в приповерхностном слое возникает электроосмотический поток, следствием которого является наблюдаемое повышение электропроводности в вершине конуса, и который размывает слой положительно заряженных белковых молекул.

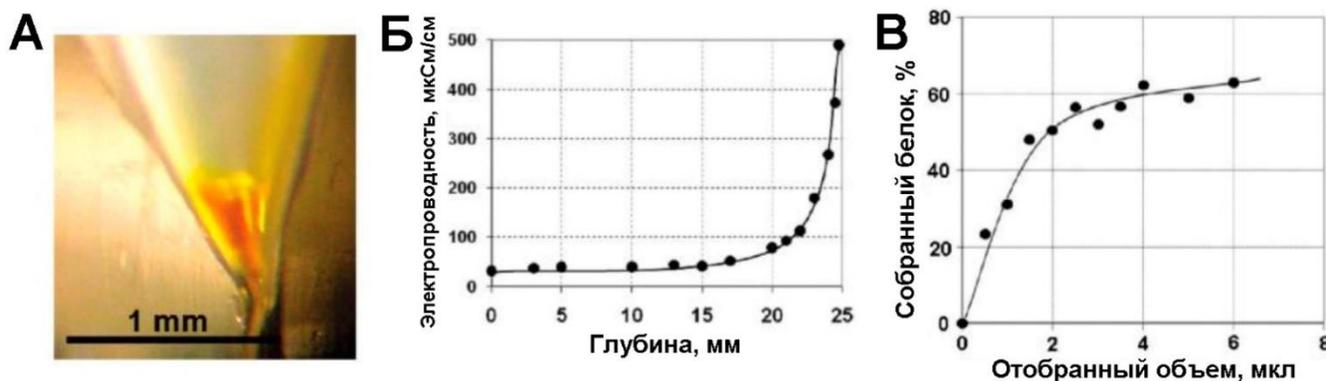


Рис. 84. Концентрирование в конусе из диализной мембраны и эффекты поляризации. (А) Изображение 1 мкг сконцентрированного ФИТЦ-БСА в пиридин-боратном буфере, рН 8,5. (Б) Зависимость проводимости раствора ФИТЦ-БСА после 15-минутного концентрирования белка (0,5 мкг/мл) от глубины погружения электрода. (В) Эффективность сбора ФИТЦ-БСА в зависимости от общего объёма аликвот, взятых из вершины конуса.

В то же время отрицательно заряженные макромолекулы избегают попадания в электроосмотический поток из-за электростатического отталкивания от мембраны, и поэтому слой сконцентрированного белка не разрушается. Чтобы подтвердить эту гипотезу, для концентрирования СуТ с использовали положительно заряженную мембрану, полученную модификацией исходной диализной мембраны спермидином. Только в этом случае при отрицательном потенциале на нижнем электроде наблюдали концентрирование СуТ с (данные не приведены). При такой полярности анионы становятся лидирующими ионами в анионообменной мембране, а катионы накапливаются в вершине конуса, образуя стабилизирующий слой соли.

Отключение потенциала приводит к быстрому падению проводимости в вершине конуса. Происходящие изменения в поляризационном слое регистрировали измерением буферной проводимости в вершине конуса с помощью микроэлектрода сразу после проведения электрофореза (рис. 83Б). Полученные данные показывают, что после отключения напряжения проводимость изменяется по диффузионному закону. Стоит отметить, что двукратное уменьшение проводимости в отсутствие белков происходит примерно за 80 с, тогда как аналогичное двукратное увеличение размера окрашенной зоны ФИТЦ-БСА занимает ~200 с (рис. 83А). Это означает, что вслед за расширением поляризационной зоны «облако» белка расширяется не так быстро, но всё же много быстрее, чем могут диффундировать свободные молекулы белка. Можно также оценить проводимость в вершине конуса во время заключительной стадии концентрирования. Поскольку первое измерение проводимости проводили через 4-5 с после выключения напряжения, линию регрессии на рис. 83Б экстраполировали на нулевое время. Проводимость буфера составила 541 мкСм/см, что соответствует проводимости ~4 мМ раствора КСl. Конечно, изменения проводимости в присутствии белков будут другими.

Удивительно, но несмотря на приложенные усилия, в экспериментах не было отмечено значительных изменений рН. Рис. 85А показывает, что в вершине конуса после процедуры концентрирования пиридин-боратного буфера изменения не превышают 0,1 ед. рН. Существенно большие изменения потенциала окисленного иридиевого электрода наблюдаются при добавлении небольшого количества ФИТЦ-БСА. Тем не менее, помещая микроэлектрод в

растворы, имеющие одинаковый рН, но содержащие различные концентрации белка, найдено, что рН уменьшается с увеличением концентрации белка. Следовательно, видимый градиент рН, наблюдаемый в конусе в присутствии белка (рис. 85А), является артефактом его адсорбции на рН-электроде.

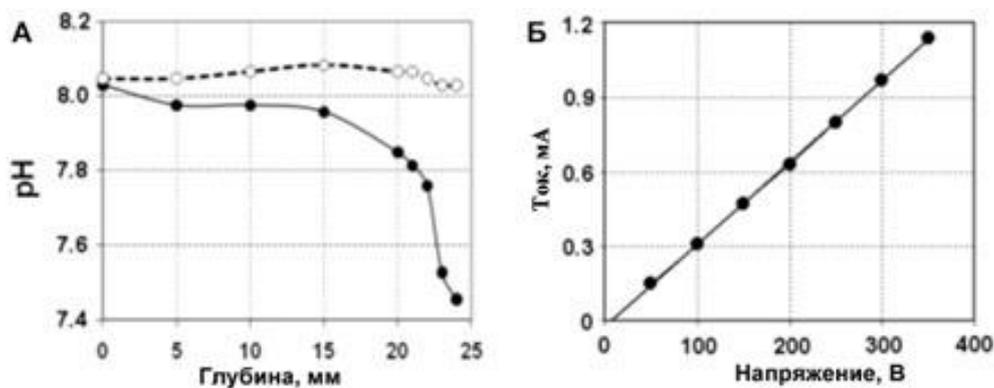


Рис. 85. Изменения рН раствора в конусе и вольт-амперных характеристик концентратора. (А) рН раствора как функция глубины после 15 мин электрофореза пиридин-боратного буфера (пустые кружки) и в присутствии 0,5 мкг/мл ФИТЦ-БСА (заполненные кружки). (Б) Вольт-амперная характеристика концентратора после электрофореза пиридин-боратного буфера в условиях, обеспечивающих максимальную плотность тока (уровень буфера в нижней камере только касался вершины конуса).

Небольшие изменения в рН в процессе поляризации на катионообменных мембранах с высокой плотностью тока описаны в литературе [340]. По мнению авторов, при высокой плотности трансмембранный ток становится избыточным из-за протонов, образующихся при диссоциации в сильном поле, которые, перемещаясь через мембрану, нейтрализуют гидроксил-ионы в вершине конуса; при этом переход сопровождается ступенчатым повышением электрического сопротивления и разрывом вольт-амперной характеристики ячейки. Однако при использовании конического концентратора не было зарегистрировано значительных отклонений в полученных характеристиках от сопротивления в широком диапазоне напряжений (рис. 85Б), что делает это объяснение сомнительным.

Помимо подавления конвекции, поляризация в значительной степени уменьшает электрическое поле в вершине конуса, тем самым предотвращая перегрев белка. Температуру на конечной стадии концентрирования белка (имидазол-глициновый буфер с добавкой 1 мкМ бромфенолового синего для контроля процесса концентрирования) измеряли с помощью микротермопары (0,2 мм), помещённой в вершину конуса. При постоянном напряжении 300 В, приложенном к платиновым электродам, ток снизился с 1 до 0,4 мА, а температура в вершине

увеличилась на 4-5 °С, при этом уровень буфера в нижней электродной камере снизился на 1 - 2 мм ниже вершины конуса. Это наблюдалось в процессе концентрирования образцов трёх разных белков, подтверждая, что в наших условиях никакого существенного перегрева образца не происходит.

Визуально белок концентрируется в объёме 10 - 20 нл, однако такую маленькую пробу собрать чрезвычайно трудно. Поэтому из вершины конуса отбирали аликвоты по 0,5 мкл. Первые 0,5 мкл содержали только ~30% исходного ФИТЦ-БСА. В последующих 3-4 пробах было обнаружено уже 60-70% белка. Таким образом, концентрация белка в первом образце повысилась примерно в 600 раз по сравнению с начальным раствором. По результатам измерения флуоресценции различных проб можно сделать вывод, что вне окрашенной зоны осталось не более 10% ФИТЦ-БСА, предположительно, из-за неизбежного перемешивания при взятии аликвот, конвекции и десорбции белка с поверхности конуса после выключения тока. После процедуры концентрирования флуоресцентный сигнал в верхней и нижней электродных камерах отсутствовал. Следует отметить, что в общем случае эффективность процесса можно визуально контролировать добавлением небольших количеств бромфенолового синего, который концентрируется вместе с белком. Однако в наших экспериментах, в отличие от белка, только 20 - 30% красителя было обнаружено в нескольких пробах, взятых в вершине конуса, вероятно, из-за проницаемости диализной мембраны для молекул бромфенолового синего.

Для проверки возможности экстракции белков из геля после электрофореза в денатурирующих условиях, было исследовано, могут ли комплексы белка с SDS эффективно собираться из разбавленных растворов. Показано, что присутствие SDS не мешает процедуре концентрирования. В первой аликвоте 0,5 мкл было обнаружено примерно 30-40% всего ФИТЦ-БСА. В последующих пробах общий выход увеличился до 80%. Примечательно, что денатурированный кипячением с SDS белок может быть собран с лучшим выходом по сравнению с нативным. Очевидно, что большой отрицательный заряд белковых SDS-комплексов приводит к более высокой электрофоретической подвижности, при этом SDS препятствует адсорбции на поверхности конуса и агрегации белка.

Концентрирование белка в присутствии мочевины приводило к гораздо более низким выходам. После концентрирования в конусе из диализной мембраны с MWCO 12-14 кДа детектировали 78% ФИТЦ-БСА, а в денатурирующих условиях это значение снижалось до 6,5%. Вероятно, используемые диализные мембраны проницаемы для развёрнутых молекул ФИТЦ-БСА. Хотя диффузия может быть медленной и только часть развёрнутого белка может проникать в мембрану, белковые молекулы, застревают в ней, не могут скользить вдоль поверхности мембраны к вершине конуса. Это объяснение подтверждается прямым наблюдением таких

«застрявших» молекул. В конце опыта после отмывки мембраны при УФ-освещении в области вершины конуса был замечен флуоресцентный сигнал.

5.2.3. Сбор белков на активированных магнитных частицах

После концентрирования белок собирается в объёме 10-20 нл, что соответствует степени концентрирования $\sim 10^5$ раз. Как уже отмечалось, в полной мере использовать чрезвычайно высокую степень концентрирования затруднительно. Например, при отборе сконцентрированного белка из вершины ячейки с помощью шприца в 5 мкл раствора содержалось всего 60% от его исходного количества (рис. 84В). Поэтому для эффективного использования конического концентратора была разработана новая методика сбора белка с последующим его анализом. Для этого в вершину конуса предварительно помещали активированные МЧ, способные к химическому связыванию любых белковых молекул, содержащих свободные аминогруппы (рис. 86). Известно, что присутствие любого конкретного белка в образце может быть выявлено по его взаимодействию с частицами со связанными специфическими антителами. Аналогичный принцип был предложен Эспинсом с соавт. под названием «обращённо-фазовый микрочип» [341]. В нашем случае комбинация концентрирования в конусе и сбора с помощью EDC/NHS-активированных МЧ решает несколько проблем. Во-первых, из-за высокой концентрации белка в вершине конуса конкуренция между гидролизом NHS-эфира и его реакции с белками резко меняется в пользу последней, обеспечивая полное связывание белка. Во-вторых, нанолитровые объёмы становятся доступными для исчерпывающего сбора белков. В-третьих, магнитные частицы можно использовать как чрезвычайно чувствительные активные метки для распознавания конкретных белков с помощью микрочипов.

Для проверки эффективности разработанного метода подходящим биологическим объектом является конденсат выдыхаемого воздуха, для которого характерны сильное разбавление ценных белковых биомаркеров, содержащихся в лёгочной жидкости, и низкая электропроводность.

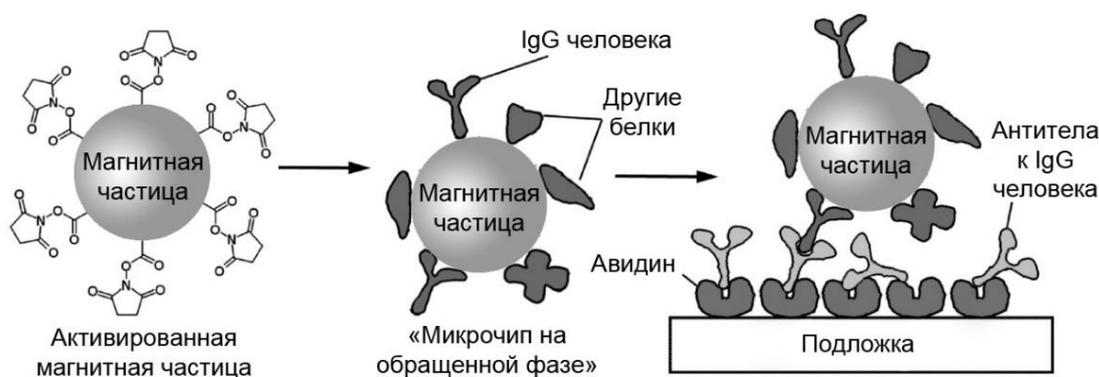


Рис. 86. Обнаружение собранных белков с помощью магнитных частиц. Карбоксилированные частицы активировали с использованием EDC/NHS-эфира и помещали в вершину конуса. Магнитная частица с h-IgG и другими белками, собранными в вершине конуса, связывается на микрочипе с биотинилированными анти(h-IgG).

В модельном эксперименте по определению иммуноглобулинов в конденсате выдыхаемого воздуха, известные количества h-IgG были сконцентрированы в конической ячейке с предварительно помещёнными в ее вершину карбоксилированными МЧ, активированными EDC/NHS. Затем МЧ извлекали из ячейки и анализировали на микрочипе с иммобилизованными антителами к h-IgG. При помещении частиц на микрочип по появлению пятен анти(h-IgG) были обнаружены молекулы иммуноглобулина. Предел обнаружения метода рассчитывали в серии контрольных экспериментов с известными количествами h-IgG, добавленного в буфер. Полученное значение ПрО h-IgG составило 0,5 пг/мл (3 фМ). Отметим, что в одной из трёх попыток удалось получить сигнал при концентрации белка 0,05 пг / мл.

Таким образом, с помощью разработанного метода в реальных образцах конденсата выдыхаемого воздуха можно детектировать фемтомолярные концентрации h-IgG.

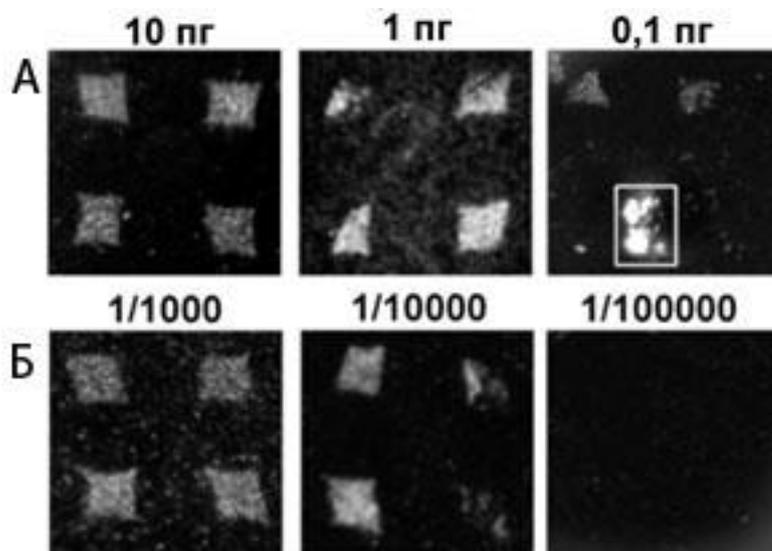


Рис. 87. Детекция белков, собранных на поверхности микрочипа с анти(h-IgG) магнитными метками после электрофоретического концентрирования. (А) Модельный эксперимент с h-IgG. Объем образца - 2 мл. Сконцентрированный h-IgG собирали 5×10^5 МЧ. Область, отмеченная белым прямоугольником, - дефект на поверхности микрочипа. (Б) Анализ сконцентрированного конденсата выдыхаемого воздуха. Проявленные зоны h-IgG с 5×10^5 МЧ. Степень разведения конденсата буфером указана над изображением.

Рис. 87 ясно демонстрирует присутствие иммуноглобулинов даже в сильно разбавленных образцах конденсата: зоны анти(h-IgG) на микрочипе детектируются даже при разбавлении 1:10000. Используя полученное значение предела обнаружения, концентрация h-IgG в конденсате выдыхаемого воздуха добровольца составляет ~5 нг/мл. Эта оценка представляется разумной, учитывая естественную изменчивость содержания белка в конденсате, собранного у разных людей. Хотя некоторые авторы сообщают о содержании белка в конденсате 40 мкг/мл [342], другие дают значения на 1 - 2 порядка меньше [3, 343]. Принимая в качестве предела для общей концентрации белка в конденсате выдыхаемого человеком воздуха 400 нг/мл, можно заключить, что данным методом могут быть обнаружены белки, присутствующие на уровне $\sim 1 \times 10^{-4}$ % от общего содержания белка.

5.2.4. Выводы к разделу 5.2.

Разработан простой, быстрый и эффективный метод концентрирования заряженных макромолекул, основанный на электрофорезе в конической ячейке, изготовленной из диализной мембраны. Ячейка частично погружена в буфер, уровень которого медленно снижается. Максимальное электрическое поле внутри ячейки находится на одном уровне с поверхностью внешнего раствора. В ходе электрофореза его значение увеличивается, и максимальная напряжённость перемещается вместе с уровнем внешнего раствора, увлекая за собой и концентрируя заряженные макромолекулы. Показано, что белки могут быть сконцентрированы в течение 12-15 мин в 100 000 раз с общим выходом 60-80%. Белковые анализы могут быть собраны из нанолитрового объема с помощью химически активированных магнитных частиц. Присутствие определённых молекул белка на поверхности частиц может быть выявлено по специфической реакции с антителами, иммобилизованными на микрочипе. Такой формат «обращённо-фазового микрочипа» может быть использован для исследования сильно разбавленных образцов, таких как конденсат выдыхаемого воздуха. Метод может быть использован также в препаративных целях, для концентрирования и обнаружения следовых количеств патогенов и токсинов, при кристаллизации белков и для решения многих других задач.

5.3. Быстрый ультрачувствительный иммуноблоттинг с фотохимической иммобилизацией белков и магнитными метками

Иммуноблоттинг широко используется для обнаружения белков с помощью специфических антител. В данной части работы представлен новый вариант иммуноблоттинга, который отличается исключительной чувствительностью, быстротой и низким потреблением антител. Электрофоретическое разделение образца проводят в неденатурирующих условиях в тонком проводящем слое между целлюлозными мембранами в отсутствие полиакриламидного геля.

Предварительно поверхность мембраны сглаживается осаждением слоя целлюлозы и модифицируется азидофенильными группами, позволяющими проводить фотохимическую иммобилизацию белков *in situ* после электрофореза. Белок визуализируют с помощью магнитных частиц, покрытых специфическими антителами. Таким образом исключается дополнительная трудоёмкая стадия переноса белка из геля на мембрану. Предел обнаружения интерлейкина IL-1 β достигает 0,3 фг или $\sim 10^4$ молекул, тогда как общее время блоттинга составляет около 5 мин. Применение метода демонстрируется обнаружением IL-1 β , общего IgA и IgG, специфичных к антигену *Mycobacterium tuberculosis*, в образцах выдыхаемого воздуха, полученных от здоровых субъектов и больных туберкулезом.

Вестерн-блоттинг (ВБ) широко используется в медицине и молекулярной биологии для высокоспецифического анализа белков в смесях сложного состава [345]. Однако традиционный метод имеет некоторые недостатки, детально разобранные в обзоре [346]. В первую очередь, это трудоёмкий и многоступенчатый протокол, который может приводить к ошибкам. Кроме того, при электрофоретическом переносе из геля на мембрану возможна частичная потеря белков, особенно имеющих высокую молекулярную массу [347]. Надо отметить, что постоянно предпринимаются попытки усовершенствовать те или иные стадии и разработать улучшенные методы иммуноблоттинга. Некоторые из них являются чисто техническими инновациями, которые не влияют на общие физико-химические принципы анализа [346], другие включают значительные достижения в процедурах разделения, переноса и обнаружения аналитов. Описано несколько модификаций детекции аналитов после электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Так, использование полимерной пероксидазы для усиления сигнала привело к увеличению чувствительности ВБ на два порядка [348]. Другой пример - система DigiWest®, которая исходно была нацелена на повышение производительности метода [349]. DigiWest® адаптирует Вестерн-блот к платформе на основе микрочипов. Технология объединяет электрофоретическое разделение предварительно биотинилированных белков в ПААГ с их последующей иммобилизацией на микросферах. Для этого мембрану с перенесёнными белками нарезают на полоски, которые переносят в лунки с покрытыми нейтравидином частицами. Аналиты элюируются с мембранных полосок, связываются с частицами, после чего анализируются. Сообщалось об автоматической микрофлюидной платформе, выполняющей электрофорез в нативном полиакриламидном геле с последующей иммунодетекцией [350, 351]. Хе и соавт. [350] описали метод быстрого разделения белков в ПААГ, совмещённого с иммуноблоттингом *in situ*. Для этого использовали модифицированный стрептавидином полиакриламид, а мембраны для блоттинга покрывали биотинилированным антителом. В модельной системе флуоресцентно-меченных белков метод показал ПрО 50 фг, время анализа составило 5 мин. Отметим, что специфическое связывание

аналита на мембране с иммобилизованными антителами делает технологию ближе к иммуноанализу на микрочипах [43], чем к традиционному ВБ. Еще одним нововведением, которое значительно облегчило автоматизацию анализа, является замена электрофореза в пластинах геля на капиллярный электрофорез (КЭ) в различных форматах, включая микрофлюидные чипы [352, 353]. Андерсон и соавт. [354] разработали метод иммуноблота с пределом обнаружения 50 пг и общим временем анализа 1 ч. В этом случае при подключении выхода КЭ к движущейся мембране на ней появляются следы образца, которые затем анализируются с помощью специфических антител. Перевод метода в формат микрофлюидных чипов позволяет проводить мультиплексный анализ [355]. Для получения автоматизированного коммерческого решения SimpleWestern, КЭ объединили с фотохимической иммобилизацией и высокочувствительным хемилюминесцентным обнаружением [356, 357]. После разделения молекулы аналита ковалентно иммобилизуются на модифицированной бензофеноном внутренней поверхности капилляра при УФ-облучении и детектируются антителами, мечеными ферментом, с ПрО около 1 пг. Иммобилизация происходит на стенках капилляра, и молекулы белка должны диффундировать из объёма капилляра к стенкам; при этом возникающие диффузионные ограничения значительно понижают чувствительность метода. Отмечается, что применение “rolling circle” амплификации с ДНК-мечеными антителами может дополнительно увеличить чувствительность в несколько раз [358]. А. Герр с коллегами, используя полиакриламидный гель, модифицированный фотоактивными группами, обошли отмеченные выше диффузионные ограничения и повысили эффективность фотохимической иммобилизации [359, 360]. Несмотря на то что подобная технология давно известна, в данном исполнении она позволяет значительно повысить чувствительность анализа. С использованием флуоресцентного сканера для микрочипов был достигнут предел обнаружения 25000 молекул, что соответствует нескольким фемтограммам белка. Такая высокая чувствительность делает возможным анализ лизата одиночных клеток [359, 361].

Хотя классический Вестерн-блот и его модификации хорошо подходят для большинства практических применений, существуют некоторые исследовательские задачи, для которых они не подходят из-за недостаточной чувствительности, трудоёмкой процедуры или высокой стоимости оборудования. Примером такой задачи является анализ проб выдыхаемого воздуха, содержащих фемтограммовые количества биомаркеров в сложной смеси. В настоящей работе в иммуноблоттинге применён новый способ детекции сигнала с использованием покрытых антителами магнитных частиц. Ранее он был реализован в сэндвич-иммуноанализе на микрочипах и показал ультравысокую чувствительность при времени анализа в несколько минут [22, 40, 84]. В данном случае он сочетается с новым форматом электрофореза: электрофоретическое разделение проходит в узком зазоре между соприкасающимися гидрофильными мембранами.

Новая технология позволяет обнаружить до 0,3 фг белка в течение 5 мин, она весьма экономична и не требует сложного оборудования.

5.3.1. Методы исследования

5.3.1.1. Конструкция устройства для электрофореза

Фрагмент целлюлозной мембраны (3-10 × 60-70 мм), пропитанный в Ру-боратном буфере, сгибали и зажимали между двумя предметными стеклами (25 × 25 × 1 мм), как схематически показано на рис. 88А. В петлю диаметром 1-3 мм, образованную изогнутой мембраной, загружали 1-30 мкл образца с помощью шприца (рис. 88Б). Затем закреплённую мембрану с образцом фиксировали парой винтов, чтобы бумажные электроды касались петли с образцом и противоположной стороны мембраны, как показано на рис. 88В. Фотография устройства с отключёнными электродами показана на рис. 88Г. Бумажные электроды (4 на рис. 88В) увлажняли Ру-боратным буфером. На них через платиновые электроды подавали постоянное напряжение 250 В. Значения электрического тока составляли 2-5 мА, типичная напряжённость электрического поля - 100 В/см. Нагрев, измеренный с помощью термопары, помещённой между листами мембраны, не превышал 5 °С.

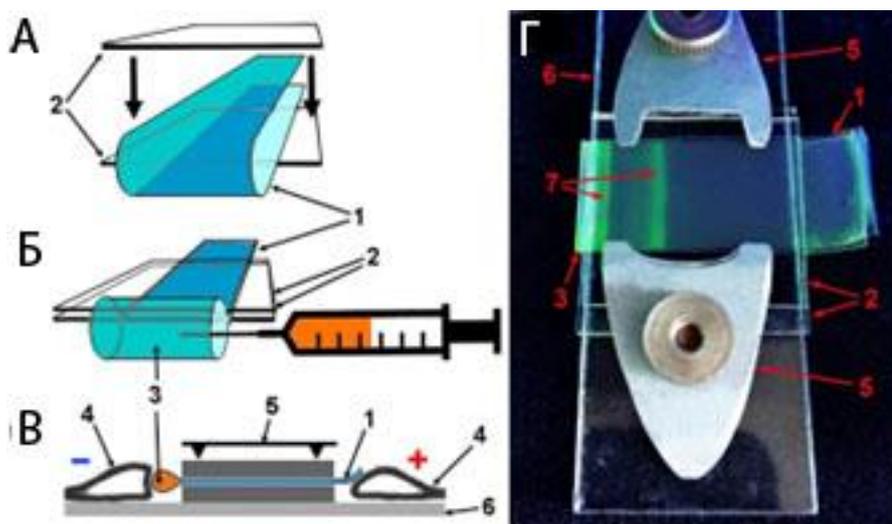


Рис. 88. Схема (А-В) и фотография (Г) устройства для электрофореза. (А) Фрагмент пропитанной в буфере мембраны (1), зажат между предметными стеклами (2). (Б) Образец загружается в петлю (3). (В) Мембрана устанавливается между бумажными электродами (4) и фиксируется с помощью винтов (5) на опору (6). (Г) Фотография в УФ показывает полосы флуоресцентного белка (7).

5.3.1.2. Сглаживание диализной мембраны

Лист диализной мембраны смачивали в воде, приклеивали к стальному уплотнительному кольцу (внутренний диаметр 65 мм) с помощью цианакрилатного клея и сушили в течение ночи. Затем мембрану обрабатывали раствором 1 мас. % толуилен-2,4-диизоцианата и 1 об. % триэтиламина в

безводном ацетонитриле в течение 1 мин, промывали ацетонитрилом и сушили в токе азота. 2%-ный раствор целлюлозы получали растворением кусочков диализной мембраны в безводном диметилацетамиде (DMAc), содержащем 8 мас. % LiCl, путём интенсивного перемешивания при комнатной температуре. Раствор целлюлозы наносили на мембрану (5 мкл раствора на 1 см²) и покрывали листом свежесколотой слюды. Затем обратную сторону мембраны приводили в контакт с водой, как показано на рис. 89. После 14 ч инкубации слюду осторожно удаляли, мембрану промывали водой и нарезали на полоски соответствующего размера, которые были использованы в АСМ, электрофорезе и экспериментах по блоттингу.

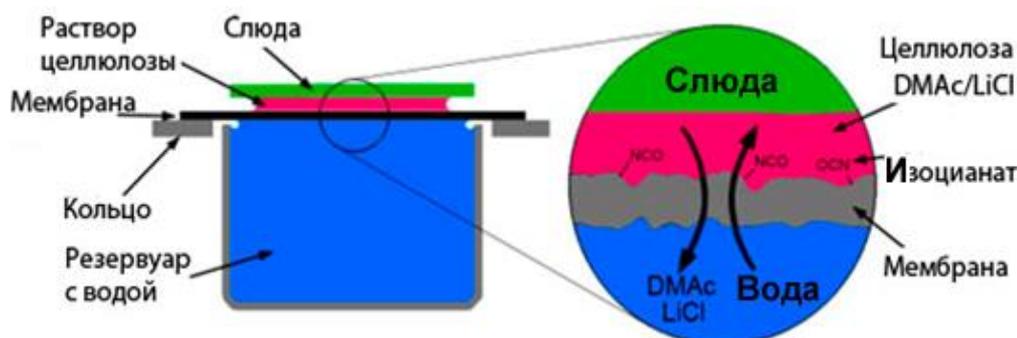


Рис. 89. Схема процедуры сглаживания поверхности диализной мембраны.

Измерения проводили с использованием атомно-силового микроскопа SmartSPMTM-1000 (AIST-NT, Россия) в полуконтактном режиме с резонансной частотой 100-150 кГц.

5.3.1.3. Измерение электрофоретической подвижности и коэффициента диффузии

Для определения электрофоретической подвижности использовали раствор ФИТЦ-БСА с концентрацией 1 мг/мл. Во время электрофореза через определённые промежутки времени получали изображения мембраны при ультрафиолетовом освещении и измеряли смещение ведущей полосы, соответствующей мономеру БСА. Для определения коэффициента диффузии после отключения электрического поля зажатую мембрану инкубировали во влажной камере. Через определённые промежутки времени измеряли уширение ведущей полосы при ультрафиолетовом освещении.

Положительно заряженную мембрану получали выдерживанием в течение 2 ч нативной мембраны в растворе, содержащем 100 мМ спермидина, 100 мМ EDC, 50 мМ MES, pH 6,0.

5.3.1.4. Определение эффективности иммобилизации белка на целлюлозной мембране

Для модификации поверхности мембраны фоточувствительными азидофенильными группами диализную мембрану помещали в раствор, содержащий 1 мас. % N-гидроксисукцинимидил-4-азидобензоата и 3 мас. % 1-метилимидазола (NMI) в DMAc, на 2 ч при комнатной температуре, промывали DMAc и водой, сушили на воздухе и хранили при + 4 °С.

Химическая схема модификации поверхности целлюлозы и последующей фотохимической иммобилизации белка приведена на рис. 90. Эффективность иммобилизации была продемонстрирована в серии контрольных экспериментов. Раствор меченного биотином БСА наносили на поверхность мембраны для получения заданной поверхностной плотности белка. Предварительно диализную мембрану обрабатывали в радиочастотном плазменном разряде в течение 15–20 с. Кусок сглаженной мембраны размером 3×3 мм² (необработанной, или модифицированной азидофенильными группами, или обработанной плазмой) покрывали 10 мкл 0,01–1,0 нг/мл раствора биотин-БСА в Ру-боратном буфере. Необработанную и обработанную плазмой мембраны инкубировали в течение 5 мин, тогда как модифицированную мембрану освещали УФ-лампой в течение 10 или 30 с на расстоянии 3 см. Обработанную плазмой мембрану погружали на 1 ч в раствор 1%-ного боргидрида натрия в 200 мМ этанолаmine, pH 8,5. Биотинилированный белок детектировали МЧ со стрептавидином.

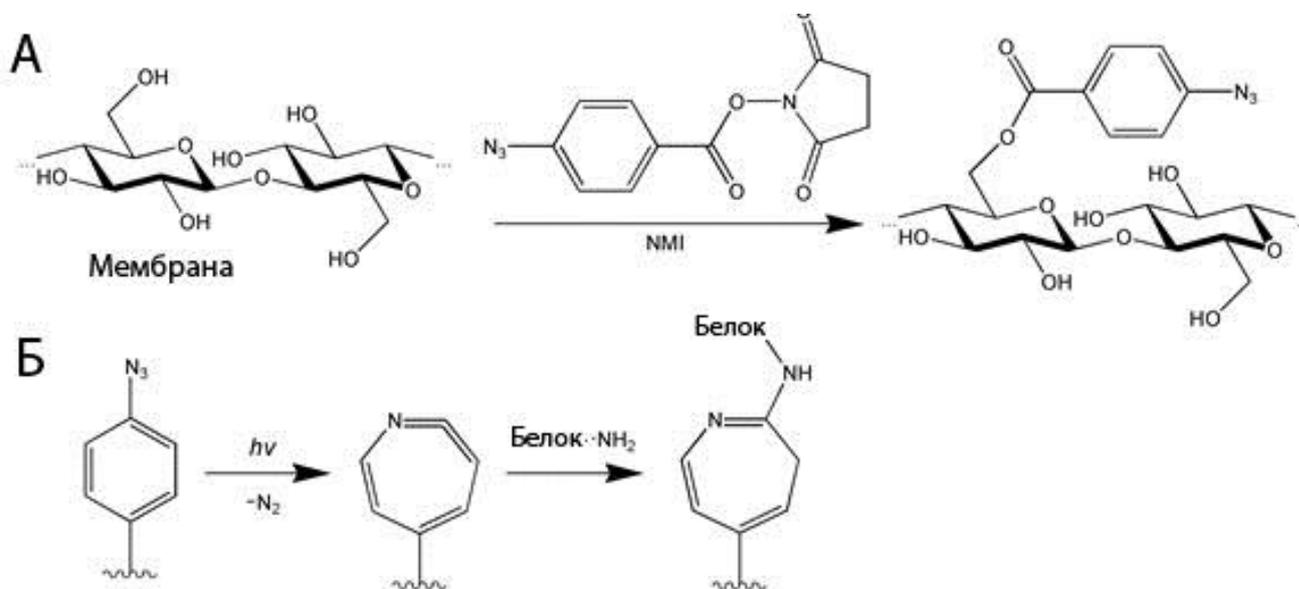


Рис. 90. Химические схемы (А) модификации поверхности целлюлозы азидофенильными группами и (Б) фотохимической иммобилизации белков.

5.3.1.5. Определение чувствительности детекции IL-1 β в традиционном дот-блоте

Капли раствора интерлейкина IL-1 β , содержащие известное количество аналита в объёме 1 мкл, наносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Protran), инкубировали в течение 5 мин, блокировали 3% обезжиренным сухим молоком в PBS-T, промывали 3×5 мин PBS-T, инкубировали в растворе биотинилированных антител против IL-1 β в PBS-T (1 мкг/мл), содержащем 3% обезжиренного сухого молока в течение 1 ч, промывали 3 × 5 мин PBS-T, инкубировали 1 ч в растворе конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена (1 мкг/мл), содержащего 3% обезжиренного сухого молока, промывали PBS-T 3 × 5 мин и один раз PBS. Затем мембрану

вымачивали в растворе “ECL” в течение 1,5 мин. Для визуализации изображения использовали установку GE Healthcare Typhoon FLA 9500. Раствор “ECL” готовили непосредственно перед использованием добавлением 3 мкл 30 мас. % H_2O_2 , 50 мкл 250 мМ люминола в диметилсульфоксиде и 22 мкл 90 мМ п-кумаровой кислоты в диметилсульфоксиде к 10 мл 0,1 М Трис, рН 8,6 [362].

5.3.2. Быстрый сверхчувствительный дот-блот

В данной части работы исследована эффективность применения магнитных меток для повышения чувствительности дот-блоттинга (рис. 91 А1-А3). В качестве модельной системы использовали IL-1 β , поскольку он считается информативным биомаркером воспаления в различных биологических образцах, например, в сыворотке [363] или бронхоальвеолярном лаваже [364]. Как уже отмечалось выше, для детекции магнитными метками требуется оптически прозрачная подложка с низким уровнем адгезии. В качестве такого субстрата вместо нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида, которые обычно используются в иммуноблоттинге, использовали мембрану из регенерированной целлюлозы, модифицированную как описано в разделе 5.3.1.4 и показано на рис. 90А.

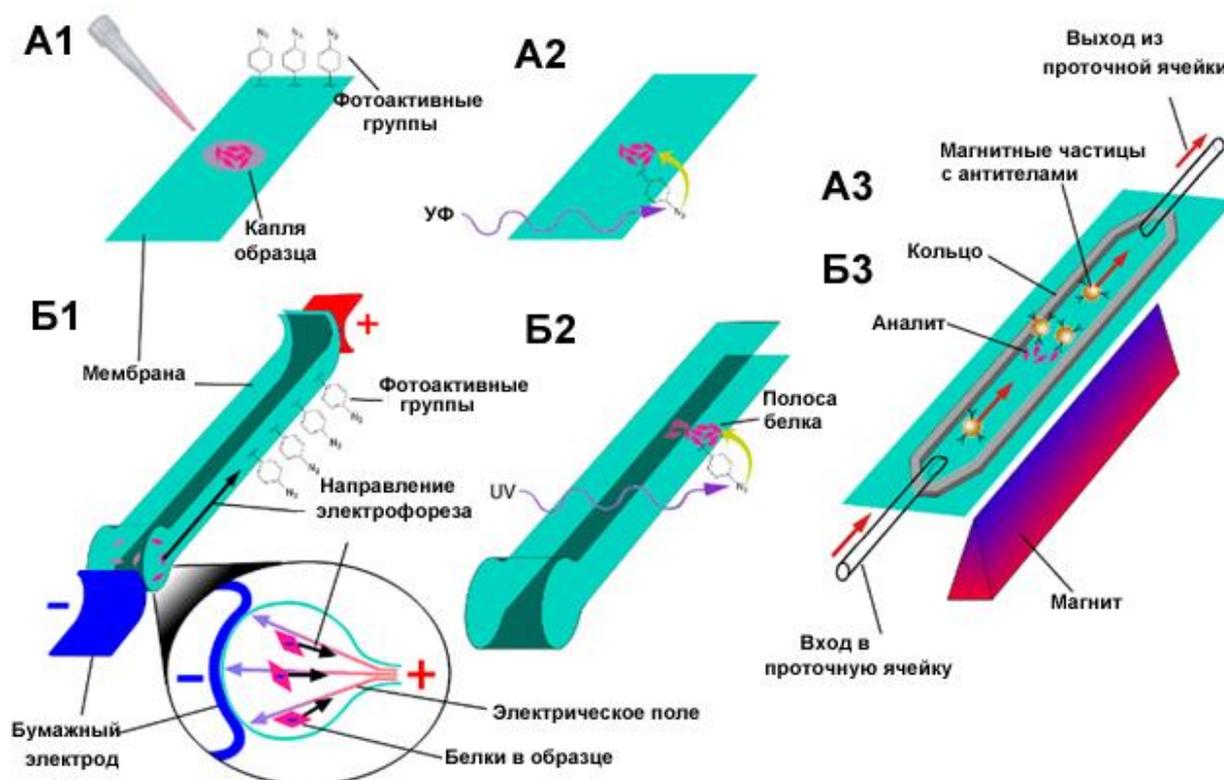


Рис. 91. Схема процедуры анализа. (А1-А3) Дот-блот с использованием магнитных меток. (А1) Образец наносят на фотоактивную поверхность. (А2) Белки ковалентно иммобилизуются на поверхности при УФ-облучении. (А3) Аналиты обнаруживаются сканированием поверхности МЧ, покрытыми специфическими антителами, в сдвиговом потоке и магнитном поле. (Б1-Б3)

Иммуноблоттинг с электрофоретическим разделением. (Б1) Перед разделением белки электрофоретически концентрируются на входе в зазор (показано на вставке). (Б2) Фракции белков фотохимически связываются на мембране. (Б3) Процедура обнаружения сигнала такая же, как и для дот-блоттинга (А3).

Перед обнаружением белковые молекулы необходимо связать с поверхностью субстрата. Для этого на поверхность мембраны вводили фотоактивные группы и после электрофоретического разделения облучали УФ. Такой подход не требует блокировки/деактивации поверхности субстрата и обеспечивает более простой и быстрый протокол (вся процедура занимает около 30 с). Фоточувствительные азидофенильные группы вводили на поверхность мембраны переэтерификацией NHS-эфира азидобензойной кислоты (рис. 91А). При УФ-облучении эти группы образуют высокореактивные промежуточные соединения, которые быстро реагируют с нуклеофильными группами белков (рис. 91Б). Следует отметить, что ковалентная иммобилизация на гидрофильном субстрате должна сохранять иммунохимические свойства белков лучше, чем адсорбция на гидрофобной поверхности в случае обычного Вестерн-блота.

Эффективность иммобилизации была продемонстрирована в серии контрольных экспериментов. Для получения заданной поверхностной плотности белка нужные количества биотин-БСА наносили на исследуемые мембраны и после иммобилизации обрабатывали МЧ, покрытыми SA. Наблюдаемые значения плотности МЧ в зонах связывания биотин-БСА на целлюлозной мембране при разных способах её обработки показаны на рис. 92. Необработанная целлюлозная мембрана, а также модифицированная азидофенильными группами, имеют незначительную неспецифическую адгезию к МЧ - <100 на мм^2 . Из данных рис. 92 следует, что 10-секундного УФ-освещения недостаточно для связывания всего нанесённого белка. В то же время после 30 с освещения фотоактивированная мембрана связывает белки с той же эффективностью, что и мембрана, активированная плазмой, использованная ранее для изготовления микрочипов. Адсорбция белков на немодифицированной целлюлозной поверхности была ожидаемо низкой. Однако при высокой поверхностной плотности белка существенное увеличение количества аналита приводило лишь к незначительному увеличению числа частиц. Таким образом, из данных рис. 92 нельзя сделать однозначный вывод, насколько индуцированная УФ-освещением иммобилизация превосходит иммобилизацию на необработанной мембране. Чтобы количественно измерить связывающую способность азидофенил-модифицированной подложки, кусочки влажной мембраны покрывали раствором Су5-меченного стрептавидина, сверху закрывали другой мембраной и освещали УФ-лампой в течение 30 с. Толщина слоя раствора белка составляла $h = 3 \text{ мм}^3 / 100 \text{ мм}^2 = 0,03 \text{ мм}$, а характерное время диффузии для такого расстояния $t = h^2 / 2D < 5 \text{ с}$, так что все молекулы белка могли достичь поверхности за время

освещения. Эти рассуждения применимы и к белкам, расположенным в зазоре между соприкасающимися мембранами, величина которого значительно меньше 0,03 мкм. Полученные флуоресцентные изображения и обработанные данные показаны на рис. 93. Видно, что насыщение поверхности достигается при плотности белка 300 нг/см². Учитывая молярную массу SA 60 кДа и размер 5 нм [365], получается, что плотный монослой содержит ~ 400 нг/см² белка. При этом неспецифическое связывание МЧ было незначительно. Таким образом была подтверждена высокая эффективность иммобилизации - почти вся поверхность покрывалась белком после УФ-облучения. В то же время связывание белка на нативной мембране, а также на модифицированной, но не облучённой мембране, было как минимум на 2 порядка ниже (рис. 93). Наконец, после модификации фотоактивными группами сглаженная мембрана ожидаемо имела ту же эффективность иммобилизации, что и нативная (интенсивность флуоресценции не отличалась больше, чем на 10%), т.к. при осаждении на мембране дополнительного слоя целлюлозы химическая природа поверхности остаётся неизменной.

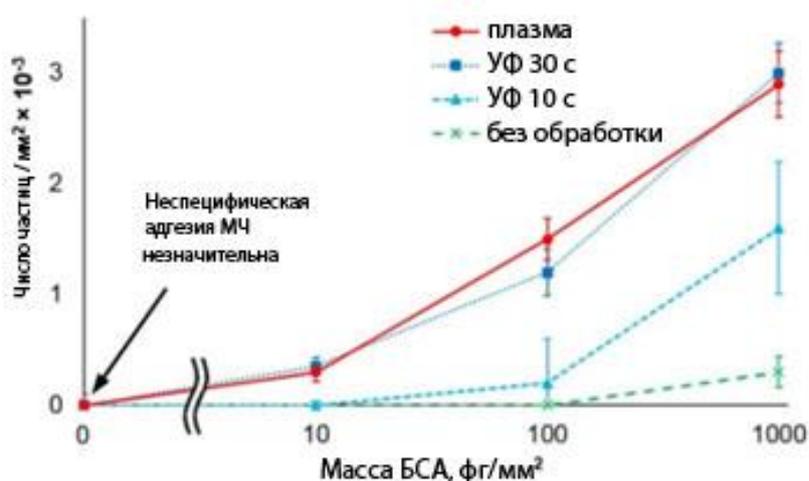


Рис. 92. Поверхностная плотность магнитных частиц как функция массы биотин-БСА на единицу площади, полученная разными способами иммобилизации белка. Пределы погрешностей соответствуют 2,5 × CO.

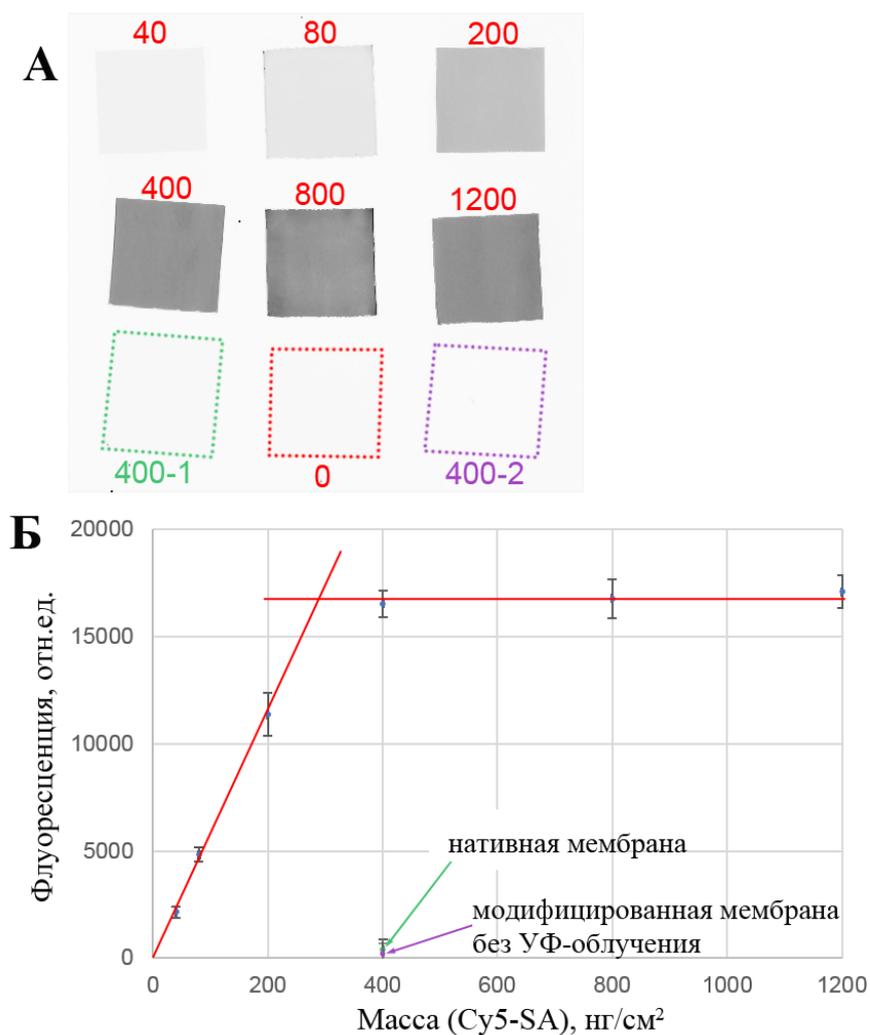


Рис. 93. Измерение эффективности фотохимической иммобилизации мембраны, модифицированной азидофенильными группами. (А) Флуоресцентные изображения модифицированной мембраны с различной плотностью белка (в $\text{нг}/\text{см}^2$). “400-1” - нативная мембрана с плотностью белка $400 \text{ нг}/\text{см}^2$, “400-2” - азидофенил-модифицированная мембрана с плотностью белка $400 \text{ нг}/\text{см}^2$ без облучения. (Б) Интенсивность флуоресценции как функция массы Cy5-SA на единицу площади. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times \text{СО}$.

После обработки мембраны УФ-светом аналиты детектировали сканированием поверхности магнитными частицами, покрытыми антителами, в магнитном поле и в сдвиговом потоке. Как уже говорилось, метод обеспечивает ультравысокую чувствительность, поскольку позволяет «метить» отдельные молекулы аналита на поверхности. Как видно на рис. 94, когда на субстрат наносили чистый белок, значение предела обнаружения составляло $0,1 - 0,3 \text{ фг}$ или менее 10^4 молекул на зону $2-3 \text{ мм}^2$. Высокая чувствительность в сочетании с простотой и быстротой эксперимента делает этот метод ценным автономным аналитическим инструментом, если в пробе нет веществ, которые могут помешать анализу. Однако такие вещества могут присутствовать в реальных биологических образцах. Когда IL-1 β добавляли к образцу выдыхаемого воздуха, полученному от

здорового добровольца, наблюдалось снижение чувствительности на два порядка (рис. 94 В). Вероятно, некоторые компоненты образца (не только белки, но и небольшие молекулы, такие как аммиак, амины и тиолы, присутствующие в выдыхаемом воздухе [366]) могут выступить конкурентами анализируемому веществу в реакции ковалентной иммобилизации. Чтобы решить эту проблему, в процедуру анализа был введен дополнительный этап электрофоретического разделения образца перед фотохимической иммобилизацией. Эффективность такого подхода продемонстрирована на рис. 94.

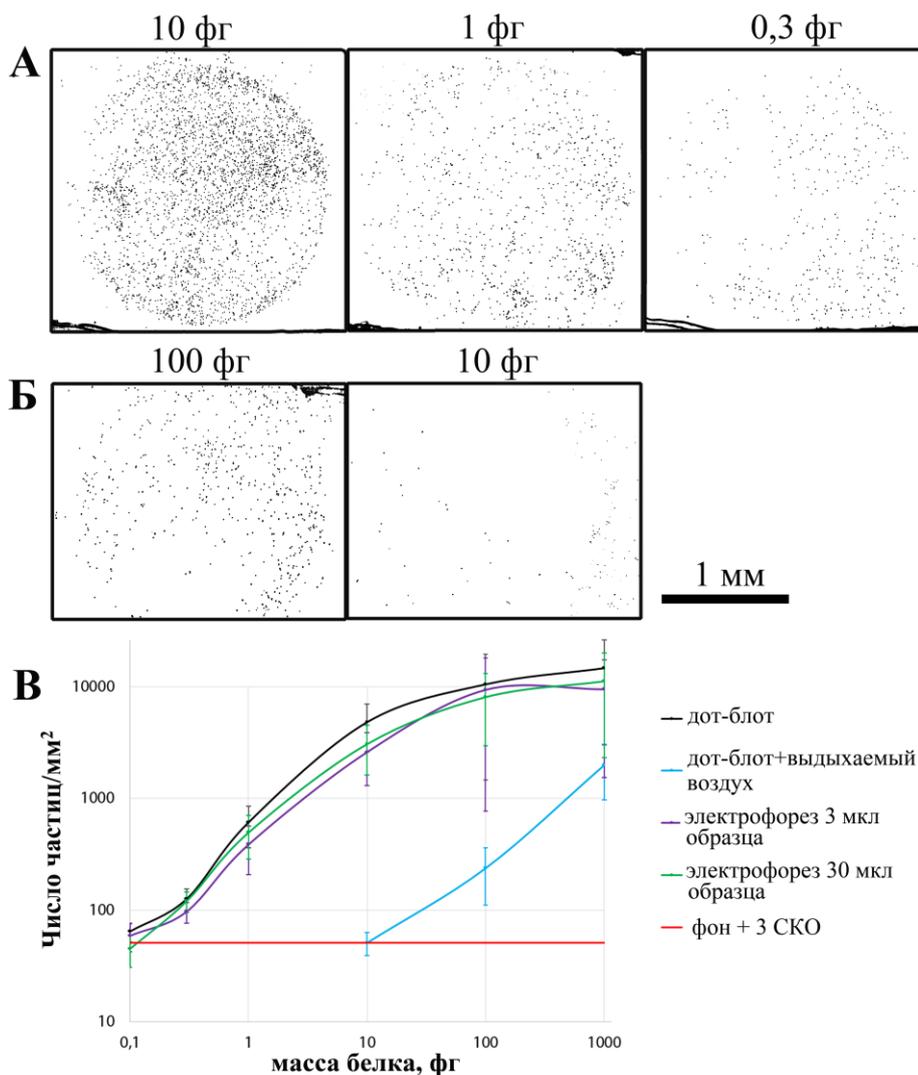


Рис. 94. (А) Дот-блот определенных количеств IL-1β с детекцией магнитными метками. (Б) Дот-блот образца выдыхаемого воздуха с указанным количеством IL-1β. Панели показаны с отрицательным контрастом. (В) Градуировочные графики для иммуноблоттинга IL-1β: дот-блот чистого белка (черного цвета); дот-блот образца выдыхаемого воздуха с добавлением IL-1β (синего цвета); иммуноблот с электрофоретическим разделением образца выдыхаемого воздуха с добавлением IL-1β (пурпурного для 3 мкл образца и зеленого цвета для 30 мкл образца); пороговое значение, определяющее минимальный обнаруживаемый сигнал (красного цвета): фон + 3 x СО.

Площадь белковой полосы составляла 2,5-3 мм² как для дот-блота, так и для иммуноблота с электрофоретическим разделением. Пределы погрешностей соответствуют 2,5 x CO.

Особенности проведения электрофореза образцов объемом до нескольких десятков мкл описаны ниже.

5.3.2.1. Проведение электрофореза белков в зазоре между гидрофильными мембранами без геля

Как показано на рис. 88 и рис. 91, фрагмент диализной мембраны, нижняя половина которой модифицирована азидофенильными группами, сгибали и зажимали между стеклянными предметными стеклами с образованием петли, в которую загружали образец. Для изучения параметров и условий электрофореза в качестве модельной системы был выбран белок с флуоресцентной меткой ФИТЦ-БСА. Он состоит из мономерной и олигомерной форм [367], поэтому на электрофореграмме присутствуют несколько полос (рис. 95А).

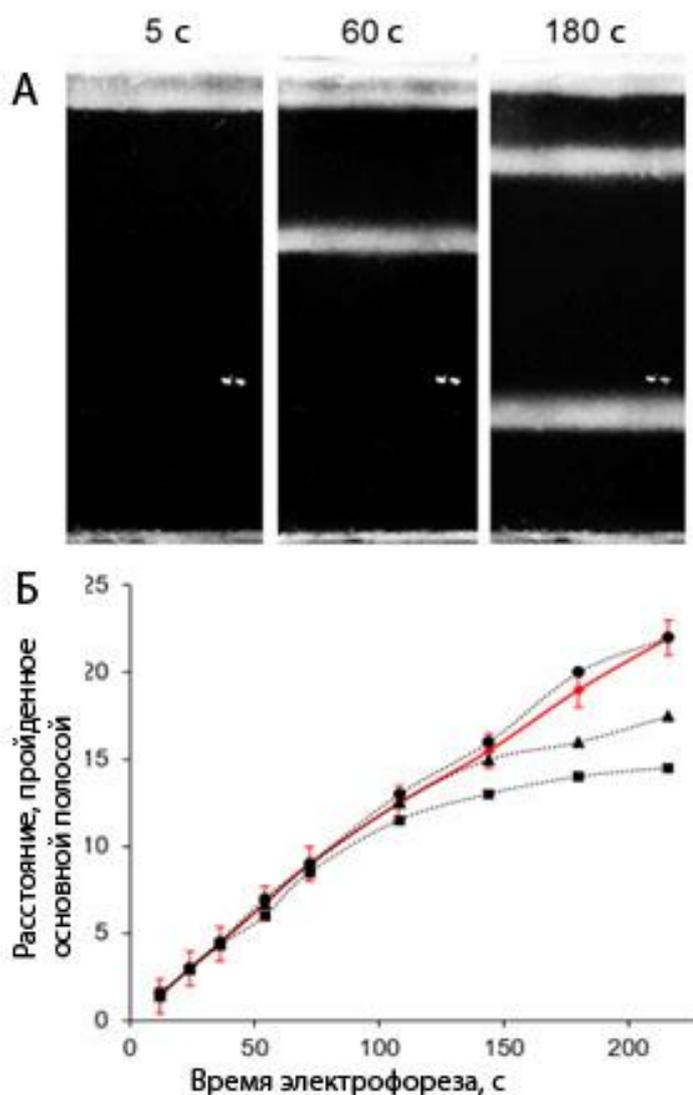


Рис. 95. (А) Примеры фотографий электрофоретических полос ФИТЦ-БСА при УФ-освещении. Высота изображений 25 мм. (Б) Электрофоретическая подвижность мономера ФИТЦ-БСА в экспериментах с нативной (три кривые чёрного цвета, полученные в 3 независимых экспериментах) и сглаженной (красная кривая, усреднённые данные из 5 независимых экспериментов) целлюлозной мембраны.

После электрофоретического разделения в петле, куда вносили образец, значительной флуоресценции не наблюдалось; это значит, что большая часть белка перемещалась в зазор между мембранами. Однако при использовании исходной коммерческой диализной мембраны подвижность белка во время электрофореза уменьшалась крайне невоспроизводимым образом (рис. 95В, черные кривые), что можно объяснить неровной поверхностью целлюлозной мембраны: в случае появления даже небольшого неуправляемого компонента электрического поля, нормального к поверхности мембраны, он направит молекулы белка в ямы на неровной поверхности, что в конечном счёте замедлит их продвижение. Иными словами, молекулы белка становятся «захваченными» неровностями и не могут двигаться дальше вдоль поверхности. Эта гипотеза была подтверждена методом АСМ: на поверхности нативной мембраны хорошо видны ямы глубиной ~100 нм (рис. 95А). Чтобы сделать поверхность более ровной, на мембрану был осаждён «лакирующий» слой целлюлозы из раствора DMAc/LiCl согласно [368]. Схема модификации приведена на рис.89. При таком способе вода диффундирует через диализную мембрану, вызывая осаждение целлюлозы, цепи которой образуют с основой уретановые связи, тогда как DMAc и хлорид лития удаляются из целлюлозного слоя в воду за счёт диффузии. Ранее было показано, что формирование плёнок целлюлозы из системы растворителей DMAc/LiCl приводит к образованию аморфной целлюлозы [369], имеющей, как предполагается, более низкую адгезию, чем кристаллическая. В свою очередь, низкая адгезия поверхности важна и необходима для эффективной иммунодетекции белков с помощью магнитных частиц. Учитывая, что 5 мкл 2%-ного раствора целлюлозы наносили на 1 см² площади мембраны, средняя толщина нанесённого слоя составляет ~1 мкм, что достаточно для сглаживания неровностей поверхности нативной мембраны. Так как слой осаждённой целлюлозы образуется в контакте с расщеплённой слюдой, которая, как известно, имеет чрезвычайно ровную поверхность, он получается достаточно гладким, что подтверждается данными АСМ (рис. 96Б). В табл. 27 приведены значения шероховатости нативной и сглаженной целлюлозных мембран.

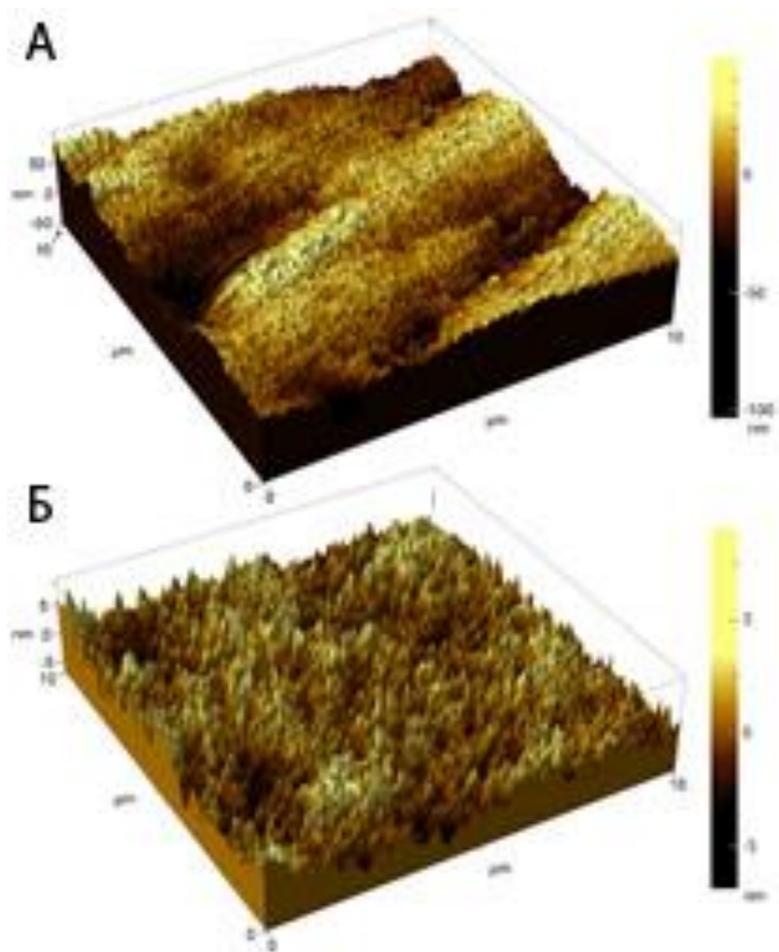


Рис. 96. АСМ-изображения репрезентативных фрагментов $10 \times 10 \text{ мкм}^2$ нативной (А) и сглаженной (Б) поверхности целлюлозной мембраны. Резонансная частота - 100-150 кГц.

Таблица 27. Шероховатость нативной и сглаженной целлюлозных мембран. Среднеквадратичная шероховатость на площади $10 \times 10 \text{ мкм}^2$ рассчитана с использованием программного обеспечения Gwyddion 2.45. Сканы 1, 2 и 3 получены на одном образце в областях, расположенных на расстоянии 3 мм друг от друга. Мембраны №1 и №2 относятся к двум независимым экспериментам по сглаживанию поверхности.

Номер скана	Шероховатость, нм			
	Исходная мембрана	Сглаженная, №1	Сглаженная, №2	Сглаженная, №2 после 2 мес. хранения при комнатной температуре
1	38	1,9	2,4	2,0
2	51	2,0	2,6	2,3
3	43	2,3	2,2	1,7

Наблюдаемый масштаб гранулярности составляет 5–10 нм, что сопоставимо с размером белковых молекул. Можно ожидать, что такая зернистость не должна мешать электрофоретическому движению белковых молекул вдоль поверхности.

5.3.2.2. Определение электрофоретической подвижности белков в зазоре между мембранами

Так как сама целлюлоза непроницаема для белковых молекул, в электрическом поле они движутся вдоль границы раздела целлюлоза-вода в водном слое между соприкасающимися гидрофильными мембранами. Толщина этого слоя была оценена двумя независимыми методами. Согласно первому, толщину слоя оценивали, измеряя площадь флуоресцентной полосы после электрофореза как функцию количества загруженного в петлю мономерного ФИТЦ-БСА. Как следует из рис. 97А, при низких количествах белка площадь полосы остаётся неизменной и определяется факторами, не связанными с достижением предельной ёмкости зазора. При более высоких значениях количества белка площадь электрофоретической полосы увеличивается линейно с наклоном, равным 20 мм^2 на один мкг белка. Предполагая, что объёмная концентрация белка в полосе составляет $\sim 10\%$ (по порядку величины это близко к предельной растворимости), можно оценить величину зазора между складками мембраны в $\sim 1 \text{ мкм}$. Согласно второму способу, проводили измерение электропроводность водного слоя, образованного парой соприкасающихся мембран. Общая проводимость представляет собой сумму проводимости мембран и заполненного буферным раствором промежутка между ними. Значение проводимости используемого Руборатного буфера составило $182 \pm 5 \text{ мкСм/см}$. Сопротивление мембраны размером $22,3 \times 11,0 \times 0,51 \text{ мм}$, измеренное вдоль поверхности, оказалось равно $1,05 \pm 0,02 \text{ МОм}$, что соответствует проводимости набухшей мембраны $38 \pm 2 \text{ мкСм/см}$, и составляет $\sim 1/5$ от проводимости буферного раствора. В ходе эксперимента сначала измеряли проводимость соприкасающихся набухших мембран, затем мембраны отделяли друг от друга, промакали фильтровальной бумагой и измеряли общую проводимость двух отдельных мембран. Разницу между этими значениями приписывали проводимости слоя, заполненного буферным раствором. С учётом значения проводимости буфера, толщина была оценена в $\sim 1 \text{ мкм}$. Кроме этого, величину зазора измеряли при различных усилиях сжатия мембран (рис. 97Б,В): она не изменялась в диапазоне давлений 0-100 кПа и только при более высоких значениях силы наблюдалось небольшое уменьшение. Это можно объяснить тем, что мембраны прижимаются друг к другу давлением Лапласа, которое для радиуса мениска 1 мкм составляет $p = 2\sigma / r = 2 \times 72 \times 10^{-3} \text{ (Дж / м}^2\text{)} / 10^{-6} \text{ м} = 140 \text{ кПа}$. Таким образом, мембраны сжимаются капиллярными силами, и небольшая дополнительная сила сжатия не влияет на величину зазора.

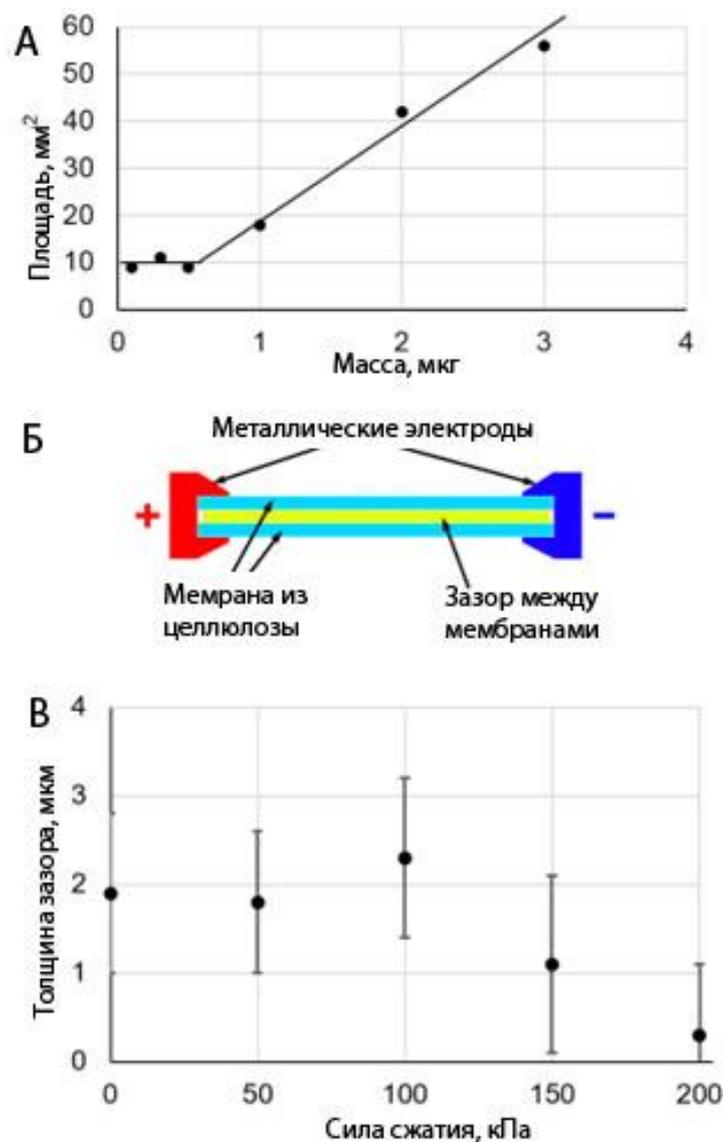


Рис. 97. (А) Площадь полосы ФИТЦ-БСА в зависимости от массы белка. (Б) Схема процедуры измерения электропроводности. (В) Величина зазора, вычисленная из данных по проводимости при разных значениях приложенной силы. Пределы погрешностей, рассчитанные по трём независимым экспериментам, соответствуют 2σ .

В итоге, оба метода приводят к величине зазора ~ 1 мкм. Очевидно, что из-за малой толщины в зазоре отсутствует значительная конвекция. Характерное время диффузии для таких расстояний составляет менее 1 с, что позволяет быстро и эффективно связывать белки, находящиеся в зазоре, на поверхности мембраны.

Для оценки электрофоретической подвижности использовали полосу, соответствующую мономерной фракции ФИТЦ-БСА. Скорость её движения составляла 0,10-0,12 мм/с при напряжённости поля 100 В/см (рис. 95Б, красная кривая). Это соответствует электрофоретической подвижности $\mu = (1,0 - 1,2) \times 10^{-4}$ см²/Вс, тогда как по опубликованным данным, подвижность БСА в растворе при ионной силе 10^{-3} М и рН 8 составляет $2-3 \times 10^{-4}$ см²/Вс [370]. Так как подвижность

белка в зазоре оказывается в два-три раза ниже, чем в растворе, он концентрируется на входе, что приводит к сужению электрофоретической полосы. На рис. 98 представлена электрофоретическая подвижность мономера ФИТЦ-БСА в Ру-боратном буфере, рН 8,0, с использованием нативной (столбец 1) и положительно заряженной (столбец 2) мембран. Кроме того, представлена подвижность в кислотном буфере, содержащем 10 мМ глицина и 10 мМ уксусной кислоты, рН 3,5, с обратной полярностью электрода (столбец 3). При таком значении рН молекулы БСА имеют примерно такой же заряд, как и при рН 8, но только с обратным знаком.

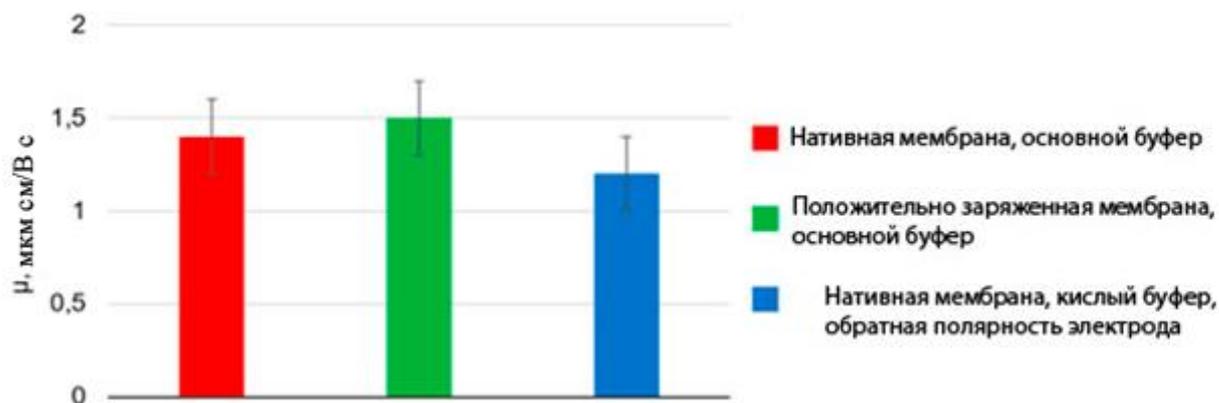


Рис. 98. Начальная электрофоретическая подвижность с различной полярностью электродов и зарядом мембраны. (1) нативная мембрана и основной буфер, (2) положительно заряженная мембрана и основной буфер, (3) нативная мембрана и кислотный буфер.

Таким образом, белок при рН 3,5 движется к катоду с той же скоростью, что и отрицательно заряженный к аноду. Так как заряд мембраны и полярность электродов не влияют на подвижность белка, можно сделать вывод, что в данных экспериментальных условиях электроосмотический поток не вносит значительного вклада в подвижность. Если бы существовал значительный электроосмотический поток, направление которого нельзя было бы изменить при переходе от рН 8 до рН 3,5 (единственными ионизируемыми группами в целлюлозной мембране являются карбоксильные), это привело бы к заметной разнице в подвижности положительно и отрицательно заряженного белка. Следовательно, наблюдаемая подвижность является чисто электрофоретической, при этом электроосмотический поток отсутствует, несмотря на то что мембрана содержит ~10 мМ отрицательных зарядов [30]. Вероятно, заряды распределены по толщине мембраны и не способны создать значительный потенциал на её поверхности.

Исходные данные для определения коэффициента диффузии ФИТЦ-БСА в зазоре между мембранами представлены на рис. 99.

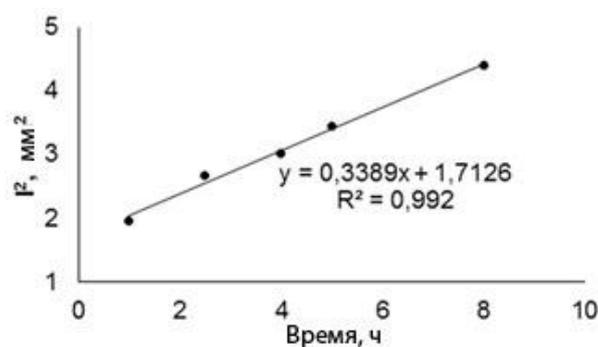


Рис. 99. Определение коэффициента диффузии ФИТЦ-БСА в целлюлозной мембране.

Наклон прямой составляет 0,34 мм²/ч, что соответствует коэффициенту диффузии $D = l^2/2t = 0,2$ мм²/ч = 5×10^{-7} см²/с. Это практически совпадает с опубликованным значением коэффициентом диффузии белка в растворе, 6×10^{-7} см²/с [371]. Вопрос заключается в том, почему коэффициент диффузии такой же, как в растворе, тогда как электрофоретическая подвижность оказывается в два-три раза ниже, как отмечено выше. Можно предположить, что это связано с небольшой составляющей электрического поля, нормальной к поверхности мембраны, которая присутствует во время электрофореза. Она прижимает молекулы белка к мембране, где их взаимодействие с поверхностью снижает электрофоретическую подвижность. В то же время диффузия происходит в отсутствие электрического поля далеко от поверхности.

Было оценено также число теоретических тарелок, N : $N = \mu U / 2D = 3 \times 10^4$, где U - напряжение, приложенное к электродам. Относительно небольшое количество теоретических тарелок связано с низкой величиной рабочего напряжения (200-300 В) по сравнению со значением, которое применяется при капиллярном электрофорезе (до 10 кВ), и может быть увеличено, если необходимо, путём использования более длинных полос мембраны и более высоких значений напряжения.

Описанные выше эксперименты по электрофорезу проводились в неденатурирующих условиях. В то же время денатурирующий SDS-электрофорез имеет большее практическое значение, поскольку позволяет определять молекулярную массу анализируемых белков, поэтому была предпринята попытка использовать разработанную методику для проведения электрофореза в денатурирующих условиях. Однако, когда SDS был добавлен к образцу и рабочему буферу в соответствии с общими протоколами SDS-PAGE (2% SDS в образце и 0,1% SDS в рабочем буфере), вместо узкой полосы наблюдался сплошной шлейф. Вероятно, денатурированные белки «вязнут» в диализной мембране [362], что приводит к неконтролируемому уменьшению электрофоретической подвижности. Таким образом, описанный способ подходит только для нативного электрофореза, а его адаптация к денатурирующим условиям требует дальнейших исследований.

5.3.2.3. Предел обнаружения IL-1 β

После того как были определены основные характеристики новых форматов электрофоретического разделения белков, можно вернуться к анализу реальных образцов аналитов с использованием рассмотренных технологий. Результирующая процедура такого анализа показана на рис. 91Б1-Б3. Стоит напомнить, что только нижняя мембрана фотохимически активирована, и весь аналит собирается на ней. При иммуноанализе образца выдыхаемого воздуха здорового человека с добавлением IL-1 β предел обнаружения составил 0,1-0,3 фг или $<10^4$ молекул (рис. 94А), как и для чистого белка. В контрольном эксперименте, если IL-1 β не был добавлен к тому же образцу, сигнал не детектировался (рис. 94Б, слева). Таким образом, хотя электрофоретическое разделение образца не обеспечивает высокого разрешения и не даёт информации о молекулярной массе анализируемых белков, оно успешно отделяет аналит от избытка других белков, а также других веществ, которые могут мешать анализу. Градуировочные графики также совпадают с полученными для дот-блоттинга (рис. 94В), подтверждая, что электрофорез не приводит к потере аналита. Динамический диапазон составляет ~ 2 порядка, при этом при малых количествах аналита сигнал растёт линейно. Уровень насыщения сигнала определяется максимальной плотностью частиц, которую может вместить ровная поверхность, а именно, $1-3 \times 10^4$ частиц/мм². При более высокой плотности магнитное отталкивание между соседними частицами становится слишком сильным [41].

Изменяя диаметр петли, можно анализировать образцы разных объемов. Используя петлю размером 3 мм и мембрану шириной 4 мм, удалось проанализировать до 30 мкл образца. Поскольку белок концентрируется на входе в зазор, как обсуждалось выше, использование большего объёма образца не приводило к значительному уширению полосы. Как показано на рис. 94В (зеленые и пурпурные линии), интенсивность сигнала не изменялась с увеличением объема образца в 10 раз при условии, что общее количество аналита в нём оставалось постоянным. Таким образом, предел обнаружения в пересчете на концентрацию составил $0,3 \text{ фг} / 30 \text{ мкл} = 10 \text{ фг} / \text{мл}$. Такая высокая чувствительность позволяет считать, что данный способ превосходит большинство традиционных методов иммуноанализа, в том числе тирамид-усиленный ИФА, используемый во многих сверхчувствительных коммерческих наборах [372]. Низкое значение предела обнаружения, достигаемое за короткое время анализа, свидетельствует о дополнительном эффекте электрофореза в нашем методе: он служит не только для отделения белков, но и для быстрого концентрирования аналита в тонком зазоре. В данном методе массообмен не является лимитирующей стадией, поскольку время диффузии через зазор размером ~ 1 мкм составляет менее 1 с. Таким образом, аналит быстро и почти количественно переносится из объёма образца на сравнительно небольшую площадь поверхности микрочипа, тогда как массоперенос в обычных

форматах иммуноанализа является основным фактором, ограничивающим чувствительность и скорость анализа.

5.3.2.4. Сравнение чувствительности различных методов детекции сигнала

Особый интерес представляет сравнение чувствительности детекции сигнала магнитными метками с флуоресцентной и хемилюминесцентной детекцией, которые обычно используются в иммуноблоттинге. Для корректного сравнения результатов вместо антител против IL-1 β , непосредственно связанных с магнитными частицами, были использованы биотинилированные антитела. Биотиновую метку детектировали МЧ, покрытыми стрептавидином. Показано, что при введении дополнительной стадии предел обнаружения IL-1 β не изменялся. После электрофореза известных количеств IL-1 β и фотоиммобилизации аналита, мембрану инкубировали в растворе биотинилированных антител против IL-1 β , промывали и использовали для обнаружения сигнала разными способами:

- 1) сканированием МЧ, покрытыми SA, как описано ранее. Значения сигнала были в пределах 1,5 x CO от соответствующих значений, полученных с МЧ, покрытыми анти-IL-1 β (рис. 94С, зеленая кривая); значение ПрО также было одинаковым ~0,3 фг;
- 2) инкубацией в растворе Су5-меченного стрептавидина, промывкой и последующей визуализацией;
- 3) инкубацией в растворе конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена, промывкой, инкубацией в растворе “ECL” и последующей визуализацией.

Результаты флуоресцентного и хемилюминесцентного обнаружения сигнала показаны на рис. 100 и рис. 101.

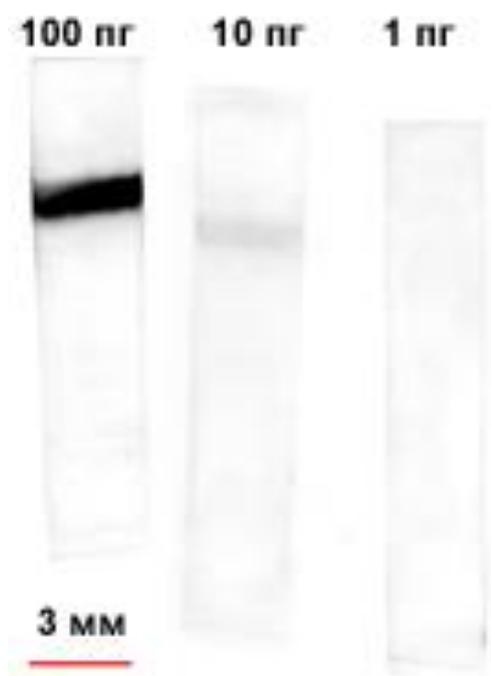


Рис. 100. Иммуноблоттинг с флуоресцентной детекцией сигнала.

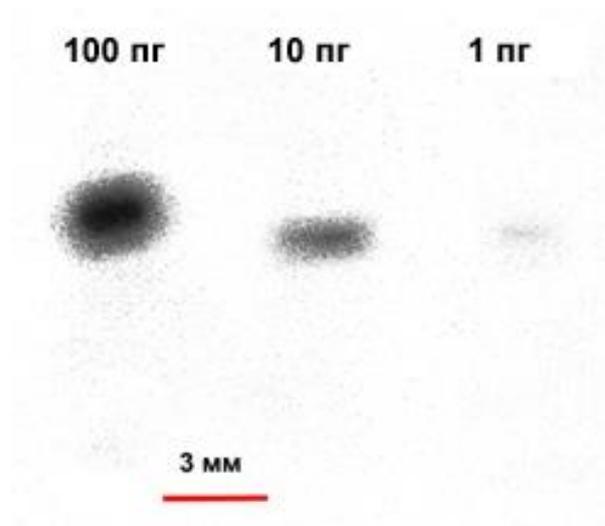


Рис. 101. Иммуноблоттинг с хемилюминесцентной детекцией сигнала.

Результаты проведения обычного дот-блота с хемилюминесцентной детекцией сигнала показаны на рис. 102.

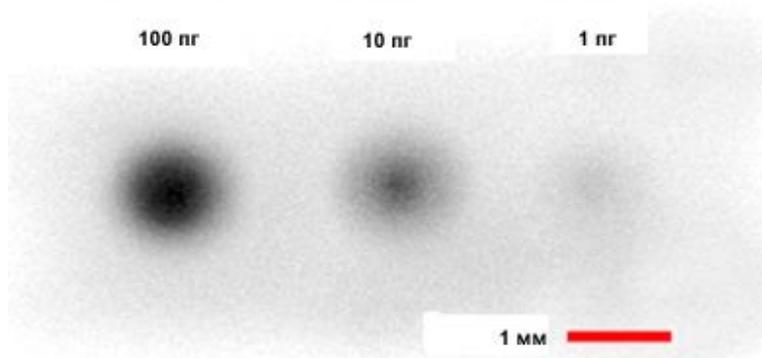


Рис. 102. Обычный дот-блот IL-1 β с хемилюминесцентной детекцией сигнала.

При использовании флуоресцентной детекции с помощью меченого Су-5- стрептавидина предел обнаружения составил 10 пг (рис. 100). Это значение совпадает с данными изготовителя сканера. Для хемилюминесцентной детекции с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза и люминола ПрО составил 1 пг (рис. 101). Наконец, дот-блот-анализ IL-1 β , выполненный следуя общепринятому протоколу на нитроцеллюлозной мембране, показал значение ПрО 1 пг (рис. 102). Надо подчеркнуть, что хотя при использовании некоторых коммерческих наборов для хемилюминесцентной детекции может быть достигнута более высокая чувствительность, тем не менее, можно констатировать, что настоящая технология оказалась чувствительнее традиционно применяемых методов, по крайней мере, на два порядка.

5.3.2.5. Определение биомаркеров туберкулёза в выдыхаемом воздухе

Ранее сообщалось о повышенных уровнях цитокинов, в частности ИЛ-1 β , в бронхоальвеолярном лаваже больных туберкулёзом [363]. Этот биомаркер был выявлен нами в образцах выдыхаемого воздуха, содержащих микрокапли лёгочной жидкости. Высокая чувствительность предлагаемого способа проведения иммуноблоттинга также позволила обнаружить ИЛ-1 β в образце больного ТБ (рис. 103В, справа). Используя приведённую выше калибровку, можно оценить количество ИЛ-1 β в образце в 0,5 фг, что превышает чувствительность большинства известных методов иммуноанализа. В то же время, как упоминалось выше, ИЛ-1 β не был обнаружен у здорового добровольца (рис.103В, слева). Этот результат представляет интерес с точки зрения неинвазивной диагностики некоторых респираторных заболеваний по следовым количествам биомаркеров в выдыхаемом воздухе.

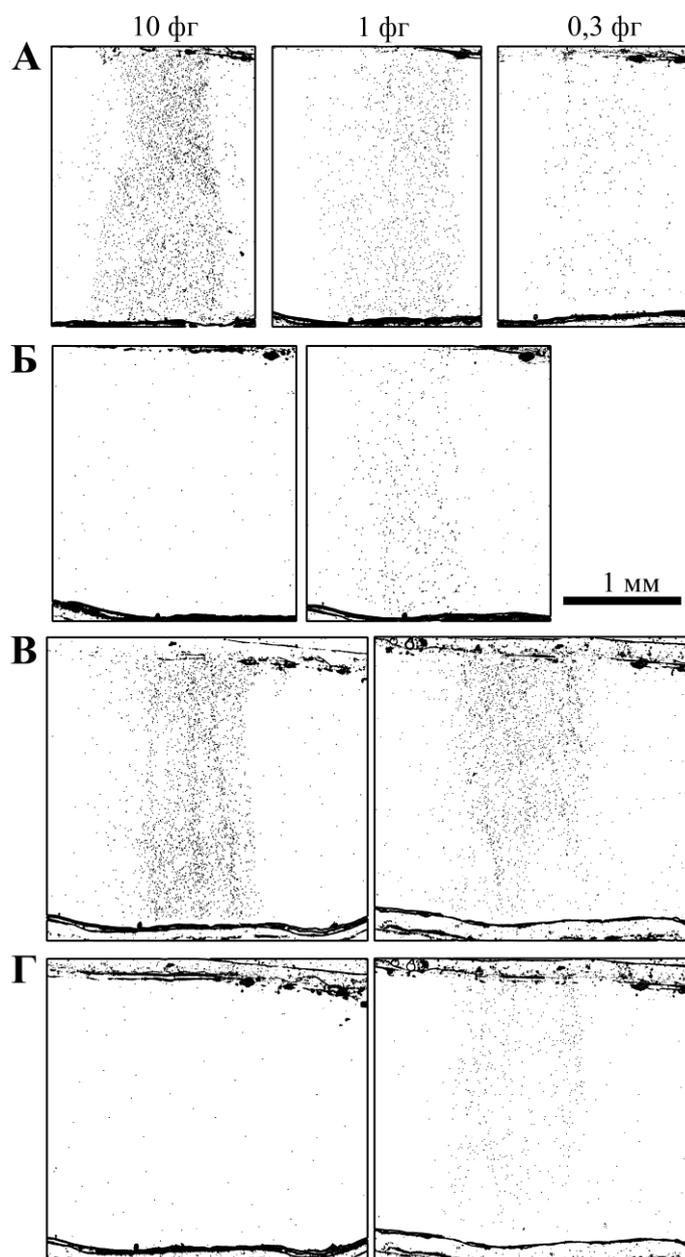


Рис. 103. Иммуноблот образцов выдыхаемого воздуха с электрофоретическим разделением и детекцией магнитными частицами в негативном контрасте. (А) Анализ образца, полученного от здорового добровольца, с добавлением указанных количеств IL-1 β . (Б) Анализ образца на присутствие IL-1 β , полученного от здорового добровольца (слева) и больного туберкулёзом (справа). Четыре образца (панель А и панель В, слева) получены у одного добровольца с интервалом 20 мин. (В) Анализ образцов, полученных у здорового человека (слева) и больного ТБ (справа), на присутствие общего IgA. (Г) Те же образцы, что и на панели (В), проанализированы на присутствие PstS1-специфических антител IgA. Панели (В и Г, слева), также как и (В и Г, справа), показывают одно и то же положение полосы.

Как уже отмечалось, дополнительным преимуществом метода является возможность последовательного сканирования одной и той же мембраны несколькими видами магнитных частиц с различной специфичностью связывания с промежуточным удалением МЧ при увеличении скорости потока до 1 мл/мин (рис. 104). Для демонстрации такой возможности был использован другой биомаркер, иммуноглобулин А (IgA), который ранее также был обнаружен в образцах выдыхаемого воздуха [15] как больного туберкулёзом, так и здорового добровольца (рис. 103В).

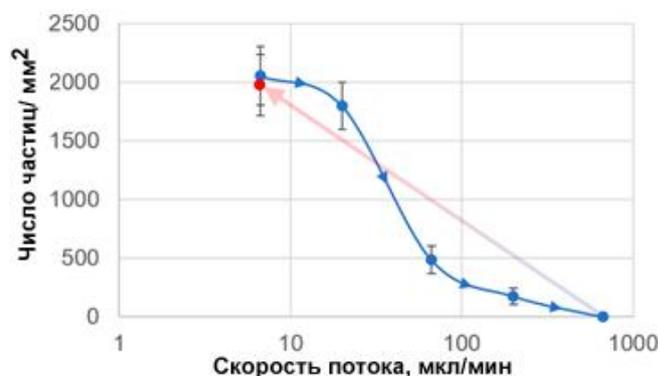


Рис. 104. Удаление магнитных частиц с поверхности с помощью ламинарного потока. Образец выдыхаемого дыхания здорового добровольца анализировали с использованием МЧ, покрытых антителами к h-IgA. После накопления сигнала при скорости потока 7 мкл/мин, скорость увеличивали до 670 мкл/мин для удаления всех первоначально связанных частиц. Для каждой скорости время действия составляло 10 с. Красный маркер представляет сигнал, полученный повторным сканированием того же образца. Пределы погрешностей соответствуют 2,5 x CO.

Последующее зондирование теми же частицами не показывает заметной потери сигнала (красный маркер на рис. 104). Известно, что нековалентные связи антиген-антитело разрушаются при нагрузке 35 - 240 пН [373], тогда как для типичной ковалентной связи значение прочности

составляет более 1 нН [374]. Таким образом, когда частица отрывается от поверхности гидродинамической силой, разрывается межмолекулярная, а не ковалентная связь между мембраной и аналитом, поэтому последний не теряется. После обработки мембраны частицами, специфичными к общему IgA, и удаления потоком связанных частиц, был проведён анализ типа «far-western», который выявил молекулы, специфичные для антигена *M. tuberculosis* Pst1, с помощью МЧ, покрытых этим антигеном (рис. 103Г). Pst1-специфичные молекулы были обнаружены в образце больного туберкулёзом (рис. 103Г, справа) и не были обнаружены в контроле (рис. 103Г, слева). Это согласуется с приведенными ранее данными, показывающими, что Pst1-специфический IgA в выдыхаемом воздухе может служить биомаркером туберкулёза [85]. Сравнивая панели В и Г на рис. 103, можно отметить, что частицы, покрытые Pst1, детектировали полосу аналита точно в том же положении, что и частицы, специфичные к общему IgA, поэтому логично предположить, что Pst1-специфические молекулы в образце являются молекулами IgA. Следует еще раз подчеркнуть, что в данных экспериментах последовательно применялись магнитные частицы с различной специфичностью (после удаления предыдущего использовался новый вид частиц), поскольку пока нет простого способа отличить на изображениях разные виды частиц.

Наконец, необходимо обсудить еще одно существенное преимущество настоящего метода. Одной из проблем распространённых методов иммуноблоттинга, является высокий расход антител. В предлагаемом методе потребление антител чрезвычайно низкое. При условии, что время сканирования составляет 2 мин при скорости потока 7 мкл/мин, в одном анализе расходуются примерно 10 мкл суспензии $5 \times 10^{-4}\%$ магнитных частиц или 5×10^{-5} мг покрытых антителами частиц. Согласно протоколу производителя, для покрытия 1 мг частиц требуется 50 мкг белка. Таким образом, расход составляет всего 3 нг антител на один анализ. Для сравнения, типичное потребление антител в Вестерн-блоттинге составляет 1 мкг [350].

5.3.2.6. Быстрый метод иммуноблоттинга для определения фемтограммовых количеств белка методом “push-pull”

Для простой быстрой детекции фемтограммовых количеств белков вышеописанный метод может быть значительно упрощён. В данном подходе предлагается визуализировать белковые полосы не сканированием МЧ в сдвиговом потоке, а путём обработки мембраны магнитными частицами, покрытыми специфическими антителами, с последующим удалением несвязавшихся частиц при помощи магнита (рис. 105). Предел обнаружения в модельной системе с биотинилированным БСА и магнитными частицами, покрытыми стрептавидином, достигает 10 фг или около 10^5 молекул при общем времени анализа около 5 мин. Применение метода было продемонстрировано обнаружением IgA в образце выдыхаемого человеком воздуха. Отметим, что

метод может быть полезен для быстрого анализа различных сложных биологических образцов, содержащих низкие количества аналита.

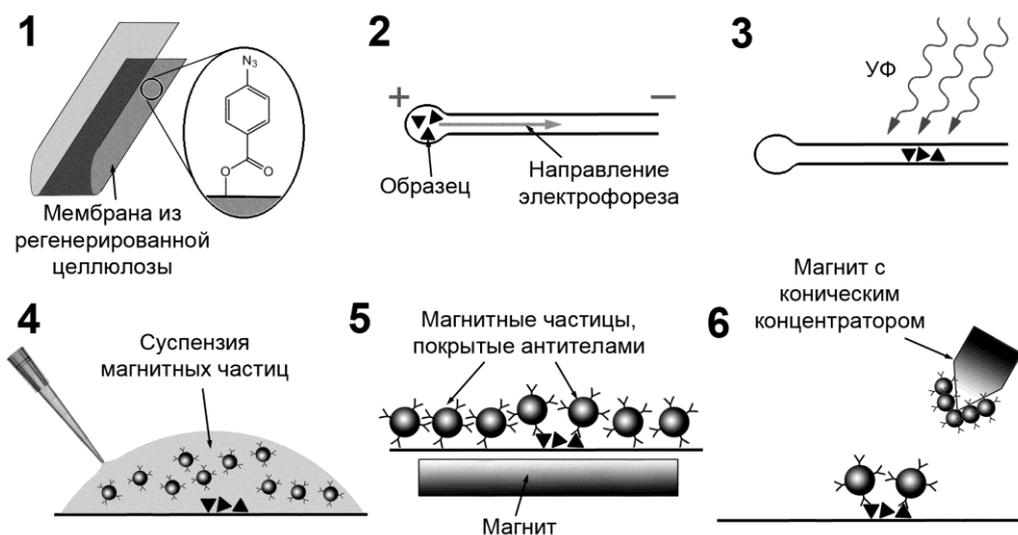


Рис. 105. Схема эксперимента. 1) Мембрана из регенерированной целлюлозы, модифицированная азидофенильными группами. 2) Образец вводится в петлю и электрофоретически разделяется. 3) Аналит фотохимически иммобилизуется на поверхности мембраны. 4) Поверхность мембраны покрывается суспензией магнитных частиц. 5) Частицы притягиваются к поверхности магнитом, расположенным под мембраной. 6) Несвязавшиеся с аналитом частицы удаляются магнитом с коническим концентратором.

На стадии 4 иммобилизованные на поверхности молекулы аналита образуют специфические связи с антителами на частицах. Конический концентратор, используемый для удаления несвязавшихся частиц, создаёт высокий градиент магнитного поля, что позволяет прикладывать к каждой частице силу ~ 1 пН. Это меньше прочности связи антиген-антитело, но достаточно для разрушения большинства неспецифических взаимодействий. Предел обнаружения метода определяли с помощью магнитных частиц, покрытых SA, и мономерного биотин-БСА. Примеры изображений, полученных с различными количествами белка, показаны на рис. 106А,Б. Градуировочный график имеет S-образную форму с динамическим диапазоном 2-3 порядка (рис. 106В), типичную для различных методов анализа с детекцией магнитными частицами [269]. Значение PrO , оценённое на основании 5 независимых экспериментов, составило ~ 10 фг, что соответствует $\sim 10^5$ молекул. С учётом типичной площади белковой полосы ~ 3 мм², это соответствует поверхностной плотности 30000 молекул/мм². Принимая во внимание, что значение сигнала составляет 400 ± 100 частиц/мм², можно оценить эффективность детекции сигнала в

предложенном методе по сравнению с детекцией магнитными частицами в сэндвич-иммуноанализе.

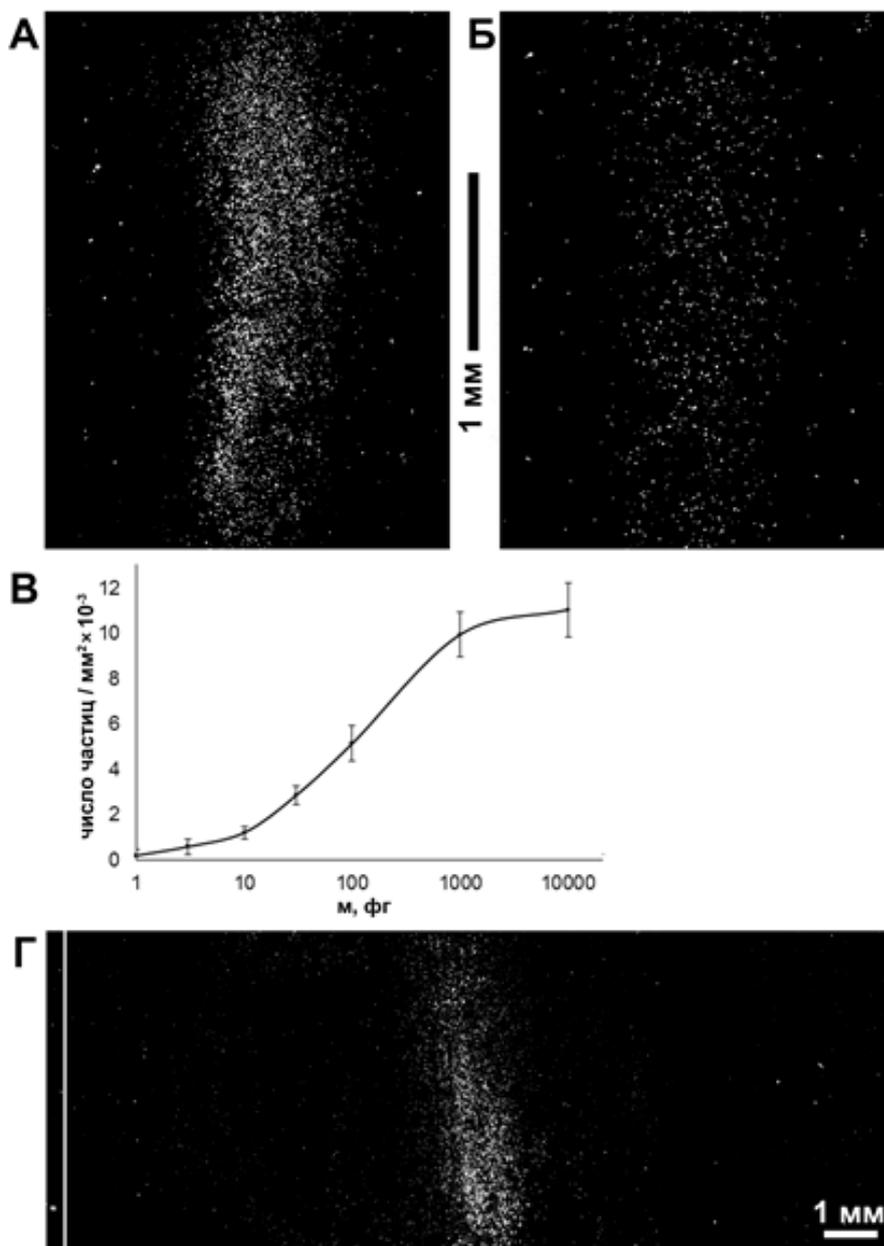


Рис. 106. Изображения полос, содержащих (А) 100 фг и (Б) 10 фг биотин-БСА, «декорированных» магнитными частицами, покрытыми стрептавидином. (В) Зависимость поверхностной плотности магнитных частиц от массы биотин-БСА в полосе. Пределы погрешностей соответствуют 3 x CO. Уровень фона ~120 частиц/мм². (Г) Иммуноблоттинг образца выдыхаемого воздуха, детекция магнитными частицами, специфическими к IgA человека. Вертикальная полоса показывает место старта электрофореза.

Как показано ранее, ПрО иммуноанализа на основе микрочипов с электрофоретическим концентрированием аналитов и детекцией магнитными частицами в сдвиговом потоке составляет

~1 фг (плотность аналита - 50000 молекул/мм²). Соответствующее значение сигнала составляет 500–1000 частиц/мм². Таким образом, и в данном методе только 1-2 % молекул белка детектируются магнитными частицами. Однако условия, в которых детектируется белок в обоих случаях, сильно различаются. В иммуноблоте только одна специфическая связь антиген-антитело удерживает частицу на поверхности, тогда как в сэндвич-иммуноанализе необходимы две связи. Менее жёсткие стерические условия детекции аналита делают иммуноблот более чувствительным, чем сэндвич-анализ. С другой стороны, в анализе на основе микрочипов для детекции используется сканирование МЧ в потоке, которое обеспечивает более эффективное зондирование поверхности, чем в случае иммуноблоттинга. Эти два фактора, вероятно, компенсируют друг друга, поэтому минимальная поверхностная плотность аналита практически одинакова в обоих случаях. Очевидно, что в упрощённом варианте чувствительность иммуноблота примерно на порядок ниже, чем при сканировании поверхности мембраны магнитными частицами в проточной ячейке. Однако целью данной части работы было создание простого и быстрого способа, доступного широкому кругу исследователей, для выявления аналитов в сложных смесях и в концентрациях, которые невозможно детектировать обычными иммунохимическими методами.

В качестве подтверждения работоспособности метода проведён анализ реальных образцов выдыхаемого воздуха, собранных добровольцами с помощью специальной маски с фильтром (раздел 2.4). Как уже указывалось, содержание белка в выдыхаемом воздухе крайне мало. В качестве аналита был выбран IgA, детектированный ранее в образцах выдыхаемого воздуха в экспериментах с использованием электрофоретической проточной ячейки. Результат типичного иммуноблоттинга с детекцией магнитными метками в режиме "push-pull" приведён на рис. 106Г. Электрофоретическая полоса, обнаруживаемая в результате обработки мембраны IgA-специфическими магнитными частицами, оказалась примерно в 1,5–2 раза шире по сравнению с полосой биотин-БСА. Этот факт можно объяснить разнообразием иммуноглобулинов с различной специфичностью, присутствующих в образце. Поверхностная плотность магнитных частиц, выявляющих полосу IgA, соответствует приблизительному количеству белка 0,1–1 пг. Эта величина совпадает с типичным содержанием IgA в выдыхаемом человеком воздухе, измеренным с помощью количественного иммуноанализа [85].

Таким образом, показана эффективность нового способа проведения иммуноблоттинга методом "push-pull" без стадии переноса белка из геля на мембрану и с детекцией сигнала магнитными частицами. Преимуществами метода являются простота, высокая чувствительность и быстрота: предел обнаружения достигает 10 фг или около 10⁵ белковых молекул в 1-30 мкл образца при времени анализа ~5 мин. Предложенный способ анализа сложных биологических образцов, содержащих фемтограммовые количества аналитов, не требует больших материальных затрат и может быть выполнен в любой лаборатории, имеющей простое техническое оснащение.

5.3.3. Выводы к разделу 5.3.

Разработан новый быстрый и сверхчувствительный способ проведения вестерн-блоттинга без стадии переноса белка из геля на мембрану. Электрофорез проводится вдоль поверхности целлюлозной мембраны, сглаженной осаждением целлюлозного слоя и модифицированной азидофенильными группами с последующей фотохимической иммобилизацией белков *in situ*. Ключевыми преимуществами метода являются высокая чувствительность и быстрота: предел обнаружения достигает 0,3 фг или менее 10^4 белковых молекул, а общее время иммуноблоттинга не превышает 5 мин. Ультравысокая чувствительность метода обеспечивается использованием для детекции магнитных частиц. Есть основания полагать, что предложенный метод может быть полезен при анализе сложных биологических образцов, содержащих следовые количества аналитов, когда чувствительность существующих методов оказывается недостаточной. В качестве потенциального приложения для медицинской диагностики продемонстрировано обнаружение IL-1 β , а также общего и Pst1-специфического IgA, в образцах выдыхаемого воздуха больных туберкулёзом и здоровых добровольцев. Кроме того, разработанный метод очень рентабелен: он не требует дорогостоящего оборудования и больших материальных затрат и потребляет всего 3 нг антител на один анализ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработан гибкий и универсальный набор ультрачувствительных (предел обнаружения 0,1-1 фМ) аналитических методов детекции белковых биомаркеров, фрагментов ДНК и вирусов в образцах сложного состава с характерным временем анализа до 15 мин. Для всех методов продемонстрировано практическое применение для решения важных прикладных задач биотехнологии, таких как диагностика инфекционных и онкологических заболеваний. Совокупность полученных результатов позволяет говорить о разработке направления, связанного с ультрачувствительным и мультиплексным экспресс-анализом биомакромолекул на микрочипах с применением магнитных меток. Его определяющим признаком является преодоление типичных для гетерофазного анализа кинетических ограничений, что открывает принципиально новые возможности для повышения чувствительности и специфичности анализа. Одним из достоинств предложенного подхода является возможность анализа широкого круга сложных биологических объектов без (или с минимальной) предварительной пробоподготовки.

Ряд новых решений предложен для повышения эффективности иммуноанализа и создания простых, высокочувствительных методов детекции биомакромолекул. Разработанная технология расщепляемого блокирования поверхности микрочипов позволяет значительно повысить чувствительность анализа, а также ускорить массоперенос аналита. С помощью полученных нанофильтров с калиброванными порами удалось проанализировать образцы выдыхаемого воздуха больных туберкулёзом лёгких и предложить первую тест-систему для неинвазивной диагностики этого заболевания. Такой подход представляет большие перспективы для выявления и других лёгочных инфекций по выдыхаемому воздуху.

Для диагностики урологических онкозаболеваний впервые предложен подход, основанный на использовании высокочувствительного иммуноанализа мочевых биомаркеров, которые не могут быть детектированы традиционными методами. По результатам определения раково-сетчаточных антигенов аррестина и рековерина в образцах мочи 89 больных раком почки и 50 неонкологических пациентов диагностическая чувствительность и специфичность составили 96% и 92% соответственно. Новые биомаркеры обладают предиктивными свойствами и могут быть использованы для оценки лечения и состояния больных.

На основе предложенной в работе методологии разработаны новые оригинальные устройства электрофоретического разделения и концентрирования белков до $\sim 10^5$ раз, а также ультрачувствительные методы анализа биомакромолекул, в том числе принципиально новый формат иммуноблоттинга. Предложен новый способ ультрачувствительного гибридного экспресс-анализа фрагментов ДНК с пределом обнаружения 10000 копий без амплификации.

Апробация разработанных новых тест-систем для анализа реальных биологических объектов для выявления патогенов, биомаркеров инфекционных и онкологических заболеваний продемонстрировала перспективность предложенной методологии. Сочетание аналитических характеристик таких как экспрессность, предел обнаружения, специфичность, а также простота и низкая стоимость, делает многие из разработанных методов уникальными, а полученные в настоящей работе результаты – представляющими значительный интерес для медицинской и прикладной биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методология проведения количественного мультиплексного ультрачувствительного иммуноанализа на микрочипах с внутренней нормировкой сигнала. Показано, что измерение нормированного сигнала вблизи предела обнаружения (0,1-1 фМ) позволяет определять концентрации аналитов с точностью 30%. Продемонстрировано применение метода для неинвазивной диагностики туберкулёза лёгких по выдыхаемому воздуху, собранному на нейлоновых нанопильтрах собственного производства.
2. Для мультиплексного определения пяти бактериальных токсинов предложена трехстадийная методика проведения иммуноанализа. Значения пределов обнаружения составляют до 0,1 пг/мл (1 фМ) при времени анализа не более 10 мин. Высокая специфичность продемонстрирована определением биотоксинов в образцах сложного состава, таких как молоко и мясо.
3. В результате систематических исследований разработана методология проведения ультрачувствительного высокоспецифичного гибридизационного анализа фрагментов ДНК на микрочипах на основе целлюлозной мембраны с пределом обнаружения 0,1 фМ и временем анализа до 5 мин. Эффективность метода продемонстрирована мультиплексной детекцией геномной ДНК трёх бактериальных патогенов. Установлено, что главным механизмом повреждения длинных молекул ДНК при электрораспылении является гидродинамический разрыв в ускоряющемся потоке вблизи поверхности конуса Тейлора.
4. На основании анализа адсорбционных свойств поверхности ряда полимеров предложено новое низкоадгезивное покрытие для изготовления микрочипов – пленка из термически сшитой карбоксиметилцеллюлозы. Эффективность покрытия продемонстрирована в мультиплексном иммуноанализе стафилококковых энтеротоксинов.
5. Разработана технология расщепляемого блокирования поверхности микрочипов, позволяющая повысить соотношение сигнал/фон в иммунофлуоресцентном анализе в 30 раз за счет снижения неспецифической адсорбции. В случае иммуноанализа с магнитными метками

формирование гидрофобного покрытия позволяет ускорить массоперенос аналита, а восстановление гидрофильных свойств поверхности после его удаления способствует понижению фонового сигнала.

6. Показано, что применение высокочувствительных методов анализа позволяет найти новые белковые биомаркеры урологических онкозаболеваний, присутствующие в моче больных в ультранизких концентрациях.

7. Разработаны оригинальные методы концентрирования белков в ячейках из полупроницаемой мембраны. Использование конического концентратора позволяет за 15 мин сконцентрировать белки в $\sim 10^5$ раз.

8. Разработан принципиально новый формат ультрачувствительного иммуноблоттинга, основанный на электрофоретическом разделении образца в зазоре между соприкасающимися гидрофильными мембранами. Применение магнитных меток для детекции сигнала позволяет обнаружить до 0,3 фг (10-20 зептомоль) белка за 5 мин. Аналитические возможности метода продемонстрированы определением туберкулёз-специфического иммуноглобулина А и интерлейкина-1 β в собранных на наночастицах образцах выдыхаемого воздуха больных туберкулёзом легких.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Momenbeitollahi N., Cloet T., Li H.Y. Pushing the detection limits: strategies towards highly sensitive optical-based protein detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. V. 413. № 24. P. 5995
2. Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Пределы обнаружения иммуноаналитических систем: лимитирующие факторы и способы снижения // *Журн. аналит. химии* 2022. Т. 77. №4. С. 298-311.
3. Duffy D.C. Digital detection of proteins // *Lab Chip* 2023. V. 23. № 5. P. 818-847.
4. Qu H., Fan C., Chen M., Zhang X., Yan Q., Wang Y., Zhang S., et al. Recent advances of fluorescent biosensors based on cyclic signal amplification technology in biomedical detection // *J. Nanobiotechnology* 2021. V. 19(1). P. 403.
5. Yang X., Zhao J., Chen S., Huang Y., Zhaok S. An ultrasensitive microchip electrophoresis chemiluminescence assay platform for detection of trace biomolecules // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1613. P. 460693.
6. Wu C., Garden P.M., Walt D.R. Ultrasensitive Detection of Attomolar Protein Concentrations by Dropcast Single Molecule Assays // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142(28). P. 12314-12323.
7. Kavetsky T., Alipour M., Smutok O., Mushynska O., Kiv A., Fink D., Farshchi F., Ahmadian E., Hasanzadeh M. Magneto-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in biomedical analysis // *Microchem. J.* 2021. V. 167. Article 106320.
8. Khlebtsov B., Khlebtsov N. Surface-enhanced Raman scattering-based lateral-flow immunoassay // *Nanomaterials* 2020. V. 10. № 11. Article 2228.
9. Barhoumi L., Bellagambi F.G., Vivaldi F.M., Baraket A., Clément Y., Zine N., et al. Ultrasensitive Immunosensor Array for TNF- α Detection in Artificial Saliva using Polymer-Coated Magnetic Microparticles onto Screen-Printed Gold Electrode // *Sensors* 2019. V. 19. № 3. P. 692.
10. Hwang J., Lee S., Choo J. Application of a SERS-based lateral flow immunoassay strip for rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B // *Nanoscale* 2016. V. 8. P. 11418–11425.
11. Tsurusawa N., Chang J., Namba M., Makioka D., Yamura S., Iha K., et al. Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis // *J. Clin. Med.* 2021. V. 10. № 21. P. 5197.
12. Wu C., Dougan T.J., Walt D.R. High-Throughput, High-Multiplex Digital Protein Detection with Attomolar Sensitivity // *ACS Nano* 2022. V. 16. № 1. P. 1025-1035.
13. Campion E.M., Walls D., Loughran S.T. Protein Quantitation and Analysis of Purity // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2699. P. 305-347.
14. Chang L., Li J., Wang L. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection // *Anal. Chim. Acta* 2016. V. 910. P. 12-24.
15. Singh N., Dahiya B., Radhakrishnan V.S., Prasad T., Mehta P.K. Detection of Mycobacterium tuberculosis purified ESAT-6 (Rv3875) by magnetic bead-coupled gold nanoparticle-based immuno-PCR assay // *Int. J. Nanomed.* 2018. V.13. P. 8523–8535.

16. Farka Z., Mickert M.J., Pastucha M., Mikusova Z., Skladal P., Gorris H.H. Advances in optical single-molecule detection: En route to supersensitive bioaffinity assays // *Angewandte Chemie – Int. Ed.* 2020. V. 59. № 27. P. 10746.
17. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Towards lateral flow quantitative assays: detection approaches // *Biosensors (Basel)* 2019. V. 9. № 3. P. 89.
18. Cornaglia M., Trouillon R., Tekin H.C., Lehnert T., Gijs M.A.M. Magnetic particle-scanning for ultrasensitive immunodetection on-chip // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 8213e8223.
19. Edelstein R.L., Tamanaha C.R., Sheehan P.E., Miller M.M., Baselt D.R., Whitman L.J., Colton R.J. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents // *Biosens. Bioelectron.* 2000. V. 14. P. 805–813
20. Mulvaney S.P., Myers K.M., Sheehan P.E., Whitman L.J. Attomolar protein detection in complex sample matrices with semi-homogeneous fluidic force discrimination assays // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. P. 1109-1115.
21. Tekin H.C., Cornaglia M., Gijs M.A.M. Attomolar protein detection using a magnetic bead surface coverage assay // *Lab. Chip* 2013. V. 13. P. 1053e1059.
22. Morozov V.N., Groves S., Turell M.J., Bailey C. Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic beads detection // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 12628-12629.
23. Morozova T.Ya., Morozov V.N. Force differentiation in recognition of cross-reactive antigens by magnetic beads // *Anal. Biochem.* 2008. V. 374. P. 263-271.
24. Gill D.M. Bacterial toxins: A table of lethal amounts. // *Microbiol. Rev.* 1982. V. 46. P. 86-94.
25. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*; Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, 1999, <http://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-VibrioCholerae-chapter-7.pdf>
26. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Staphylococcus aureus*.<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070015.htm>
27. Ahn-Yoon S., DeCory T.R., Baeumner A.J., Durst R.A. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin // *Anal. Chem.* 2003. V. 75, P. 2256-2261.
28. Viswanathan S., Wu L., Huang M., Ho J.A. Electrochemical immunosensor for cholera toxin using liposomes and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated carbon nanotubes // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 1115-1121.
29. Seo J.H., Kim C.S., Lee H.Y., Kawai T., Cha H.J. Interactive configuration through force analysis of GM1 pentasaccharide-*Vibrio cholera* toxin interaction // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 6011-6017.

30. Filippova M.A., Feizkhanova G.U., Zubtsova Zh.I., Stomahin A.A., Rubina A.Yu., Grishin E.V. Simultaneous and multiparametric express-analysis of biotoxins on biochip // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2011. V. 436. P. 20-24.
31. Rubina A.Yu., Filippova M.A., Feizkhanova G.U., Shepeliakovskaya A.O., Sidina E.I., Boziev Kh.M., Laman A.G., Brovko F.A., Vertiev Yu.V., Zasedatelev A.S., Grishin E.V. Simultaneous detection of seven staphylococcal enterotoxins: development of hydrogel biochips for analytical and practical application // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 8881-8889.
32. Lian W., Wub D., Lim D.V., Jin S. Sensitive detection of multiplex toxins using antibody microarray // *Anal. Biochem.* 2010. V. 401. P. 271-279.
33. Miwa K., Fukuyama M., Kunitomo T., Igarashi H. Rapid assay for detection of toxic shock syndrome toxin 1 from human sera // *J. Clin. Microbiol.* 1994. V. 32. P. 539-542.
34. Kuffner T.A., McKinney R.M., Wells D.E., Reeves M.W., Hunter S. B., Plikaytis B.D. Two-site monoclonal antibody quantitative ИФА for toxic shock syndrome toxin-1 // *J. Immunol. Methods.* 1988. V. 109. P. 85-92.
35. Goldman E.R., Clapp A.R., Anderson G.P., Uyeda H.T., Mauro J.M., Medintz I.L., Mattoussi H. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 684-688.
36. Kim J.S., Anderson G.P., Erickson J.S., Golden J.P., Nasir M., Ligler F.S. Multiplexed detection of bacteria and toxins using a microflow cytometer // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 5426-5432.
37. Ligler F.S., Taitt C.R., Shriver-Lake L.C., Sapsford K.E., Shubin Y., Golden J.P. Array biosensor for detection of toxins // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. P. 469-477.
38. Pauly D., Kirchner S., Stoermann B., Schreiber T., Kaulfuss S., Schade R., Zbinden R., Avondet M., Dornera M.B., Dorner B.G. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay // *Analyst* 2009. V. 134. P. 2028-2039.
39. Anderson G.P., Taitt C.R. Amplification of microsphere-based microarrays using catalyzed reporter deposition. // *Biosens. Bioelectron.* 2008. V. 24. P. 324-328.
40. Rucker V.C., Havenstrite K.L., Herr A.E. Antibody microarrays for native toxin detection // *Anal. Biochem.* 2005. V. 339. P. 262-270.
41. Salmain M., Ghasemi M., Boujday S., Spadavecchia J., Techere C., Valf F., Le Moigne V., Gautier M., Briandet R., Pradier C.-M. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 29. P. 140-144.
42. Chiriaco M., Primiceri S.E., D'Amone E., Ionescu R.E., Rinaldi R., Maruccio G. EIS microfluidic chips for flow immunoassay and ultrasensitive cholera toxin detection // *Lab. Chip* 2011. V. 11. P. 658-663.
43. Groves S., Turell M.J., Bailey C.J., Morozov V.N. Rapid active assay for the detection of antibodies to West Nile virus in chickens // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008. V. 78. P. 63-69.

44. Morozov V.N., Morozova T.Ya. Active bead-linked immunoassay on protein microarrays // *Anal. Chim. Acta* 2006. V. 564. P. 40-52.
45. Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomahin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips // *Anal. Biochem.* 2005. V. 340. P. 317-329.
46. Helmerhorst E., Stokes G.B. Microcentrifuge desalting: a rapid, quantitative method for desalting small amounts of protein // *Anal. Biochem.* 1980. V. 104. P. 130-135.
47. Morozov V.N., Morozova T.Ya. Electrospray deposition as a method to fabricate functionally active protein films // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 1415-1420.
48. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248-254.
49. Morozov V.N., Shlyapnikov Yu.M., Kidd J., Morozova T.Ya., Shlyapnikova E.A. Conic Electrophoretic Concentrator for Charged Macromolecules // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 5548-5555.
50. Furst E.M., Suzuki C., Fermigier M., Gast A.P. Permanently-linked monodisperse paramagnetic chains // *Langmuir* 1998. V. 14. P. 7334-7336.
51. Brunet E., Degre G., Okkels F. Aggregation of paramagnetic particles in the presence of a hydrodynamic shear // *J. Colloid Interface Sci.* 2005. V. 282. P. 58-68.
52. Noy A. Force spectroscopy 101: how to design, perform, and analyze an AFM-based single molecule force spectroscopy experiment // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011. V. 15. P. 710-718.
53. Angenendt P., Glokler J., Murphy D., Lehrach H., Cahilla D.J. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials // *Anal. Biochem.* 2002. V. 309. P. 253-260.
54. Edelshtein R.L., Tamanaha C.R., Sheehan P.E., Miller M.M., D.R Baselt, L J Whitman, R J Colton The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents // *Biosens. Bioelectron.* 2000 V. 14. P. 805-813.
55. Cornaglia M., Trouillon R., Tekin H.C., Lehnert T., Gijs M.A.M. Dose-response curve of a microfluidic magnetic bead-based surface coverage sandwich assay // *N. Biotechnol.* 2015. V. 32. P. 433-440.
56. Lee G.U., Metzger S., Natesan M., Yanavich C., Dufrene Y.F. Implementation of force differentiation in the immunoassay // *Anal. Biochem.* 2000. V. 287. P. 261-271.
57. Mulvaney S.P., Cole C.L., Kniller M.D., Malito M., Tamanaha C.R., Rife J.C., Stanton M.W., Whitman L.J. Rapid, femtomolar bioassays in complex matrices combining microfluidics and magnetoelectronics // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 23. P. 191-200.
58. Tsai H.Y., Chan J.R., Li Y.C, Cheng F.C., Fuh C.B. Determination of hepatitis B surface antigen using magnetic immunoassays in a thin channel // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V.25. P. 2701-2705.
59. Florescu O., Wang K., Au P., Tang J., Harris E., Beatty P.R., Boser B.E. On-chip magnetic separation of superparamagnetic beads for integrated molecular analysis // *J. Appl. Phys.* 2010. V. 107 N. 5. P. 54702.

60. Shlyapnikov Yu.M., Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., A.O. Shepeliakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 5596-5603.
61. Balcells M., Klee D., Fabry M., Hocker H. Quantitative assessment of protein adsorption by combination of the enzyme-linked immunosorbent assay with radioisotope-based studies // *J. Colloid Interface Sci.* 1999. V. 220. P. 198-204.
62. Morozov V.N., Morozova T.Ya. Electrophoresis-assisted active immunoassay // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 6813-6819.
63. Kuban P., Foret F. Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring // *Anal. Chim. Acta* 2013. V. 805. P. 1-18.
64. Effros R.M., Dunning M.B., Biller J., Shaker R. The promise and perils of exhaled breath condensate // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004. V. 287. P. L1073-1080.
65. Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S., Behrakis P.K. Exhaled breath condensate: technical and diagnostic aspects // *Sci. World J.* 2015. V. 2015:435160.
66. Bredberg A., Gobom J., Almstrand A.C., Larsson P., Blennow K., Olin A.C., Mirgorodskaya E. Exhaled endogenous particles contain lung proteins // *Clin. Chem.* 2012. V. 58. P. 431-440.
67. Beck O., Stephanson N., Sandqvist S., Frank J. Detection of drugs of abuse in exhaled breath using a device for rapid collection: comparison with plasma, urine and self-reporting in 47 drug users // *J. Breath Res.* 2013. 7 026006.
68. Morozov V.N., Mikheev A.Y. A collection system for dry solid residues from exhaled breath for analysis via atomic force microscopy // *J. Breath Res.* 2017. V. 11: 016006.
69. Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avsenko A.V., Morozov V. N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6 // *Eur. Pol. J.* 2016. V. 75. P. 317-328.
70. Qin X.H., Wang S.Y. Filtration properties of electrospinning nanofibers // *J. Appl. Polym. Sci.* 2006. V. 102. P. 1285-1290.
71. Agarwal S., Greiner A., Wendorff J.H. Electrospinning of manmade and biopolymer nanofibers – progress in techniques, materials and applications // *Adv. Funct. Mater.* 2009. V. 19. P. 2863-2879.
72. Jiang T., Carbone E.J., Lo K.W.H., Laurencin C.T. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration // *Prog. Polym. Sci.* 2015. V. 46. P. 1-24.
73. Kim S.J., Nam Y.S., Rhee D.M., Park H.S., Park W.H. Preparation and characterization of antimicrobial polycarbonate nanofibrous membrane // *Eur. Polym. J.* 2007. V. 43. P. 3146-3152.
74. Katta P., Alessandro M., Ramsier R.D., Chase G.G. Continuous electro-spinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector // *Nano Lett.* 2004. V. 4. N. 11. P. 2215-2218.
75. Gibson P., Schreuder-Gibson H. Patterned electrospray fiber structures // *INJ Summer* 2004. P. 34-41.

76. Lavielle N., Hebraud A., Mendoza-Palomares C., Ferrand A., Benkirane-Jessel N., Schlatter G. Structuring and molding of electrospun nanofibers: effect of electrical and topographical local properties of micro-patterned collectors // *Macromol. Mater. Eng.* 2012. V. 297. P. 958-968.
77. Zhao S., Zhou Q., Long Y.Z., Sun G.H., Zhang Y. Nanofibrous patterns by direct electrospinning of nanofibers onto topographically structured nonconductive substrates // *Nanoscale* 2013, V. 5. P. 4993-5600.
78. Morozov V.N., Vsevolodov N.N. Electro spray-neutralization method for manufacturing free and supported nanomats // *Adv. Mater.* 2007. V. 19. P. 4381-4386.
79. Brown R.C. *Air Filtration*. Pergamon Press, Oxford, UK, 1993.
80. Hosseini S.A., Tafreshi H.V. Modeling permeability of 3-D nanofiber media in slip flow regime // *Chem. Eng. Sci.* 2010. V. 65. P. 2249-2254.
81. Wang J., Kim S.C., Pui D.Y.H. Figure of merit of composite filters with micrometer and nanometer fibers // *Aerosol Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 722-728.
82. Mikheev A.Y., Kanev I.L., Morozova T.Ya., Morozov V.N. Water-soluble filters from ultra-thin polyvinylpyrrolidone nanofibers // *J. Membr. Sci.* 2013. V. 448. P. 151-159.
83. Huang C., Chen S., Lai C., Reneker D.H., Qiu H., Ye Y., Hou H. Electrospun polymer nanofibers with small diameter // *Nanotechnology* 2006. V.6. P. 1558-1563.
84. Morozov V.N., Mikheev A.Y. Water-soluble polyvinylpyrrolidone nanofilters manufactured by electro spray-neutralization technique // *J. Membr. Sci.* 2012. V. 403-404. P. 110-120.
85. Filatov Y., Budyka A., Kirichenko V. *Electrospinning of Micro- and Nanofibers: Fundamentals in Separation and Filtration Processes* // Begell House Inc., New York, 2007.
86. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Yu.M., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Nwabueze A.O., Van Hoek M.L. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances // *J. Aerosol Sci.* 2014. V.69. P. 48-61.
87. Liu B., Zhang S., Wang X., Yu J., Ding B. Efficient and reusable polyamide-56 nanofiber/nets membrane with bimodal structures for air filtration // *J. Colloid Interface Sci.* 2015. V. 457. P. 203-211.
88. Stachewicz U., Modaresifar F., Bailey R.J., Peijs T., Barber A.H. Manufacture of void-free electrospun polymer nanofiber composites with optimized mechanical properties // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012. V. 4. P. 2577-2582.
89. Bergshoef M.M., Vancso G.J. Transparent nanocomposites with ultrathin, electrospun nylon-4,6 fiber reinforcement // *Adv. Mater.* 1999. V. 11. P. 1362-1365.
90. Morozov V.N. Electro spray deposition of biomolecules // *Adv. Biochem. Engin/Biotechn.* 2010. V. 119. P. 115-162.
91. Neuhaus S., Seifert L., Vautz W., Nolte J., Bufe A., Peters M. Comparison of metabolites in exhaled breath and bronchoalveolar lavage fluid samples in a mouse model of asthma // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 111. P. 1088-1095.

92. Nakhleh M., Amal H. al. Diagnosis and classification of 17 diseases from 1404 subjects via pattern analysis of exhaled molecules // *ACS Nano* 2017. V. 11. P. 112-125.
93. Papineni R.S., Rosenthal F.S. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects // *J. Aerosol Med.* 1997. V. 10. P. 105-116.
94. Darraji H.A., Altice F.L., Kamarulzaman A. Undiagnosed pulmonary tuberculosis among prisoners in Malaysia: an overlooked risk for tuberculosis in the community // *Trop. Med. Int. Health* 2016. V. 21. P. 1049-1058.
95. Torrelles J.B., Schlesinger L.S. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis // *Trends Microbiol.* 2017. V. 25. P. 688-697.
96. Kubán P., Foret F. Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review // *Anal. Chim. Acta* 2013. V. 805. P. 1-18.
97. Almstrand A.C., Ljungstrom E., Lausmaa J., Bake B., Sjovall P., Olin A.C. Airway monitoring by collection and mass spectrometric analysis of exhaled particles // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 662-
98. Morozov V.N., Mikheev A.Y. A collection system for dry solid residues from exhaled breath for analysis via atomic force microscopy // *J. Breath Res.* 2017. V. 11: 016006.
99. Tinglev S., Ullah G., Ljungkvist E., Viklund A.C., Olin O., Beck O. Characterization of exhaled breath particles collected by an electret filter technique // *J. Breath Res.* 2016. V. 10: 026001.
100. Morozov V.N., Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Nikolaev A.A., Lyadova I.V. Non-invasive lung disease diagnostics from exhaled microdroplets of lung fluid: Perspectives and technical challenges // *J. Breath Res.* 2018. V. 12: 017103.
101. McKenzie J.H., McDevitt J.J., Fabian M.P., Hwang G.M., Milton D.K. Collection of aerosolized human cytokines using Teflon® filters // *PLoS One* 2012. V. 7: e35814.
102. Shlyapnikov Y. M., Morozov V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 966. P. 47-53.
103. Morozov V.N., Nikolaev A.A., Shlyapnikov Y.M., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Bagdasaryan T.R., Burmistrova I.A., Smirnova T.G., Andrievskaya I.Y., Larionova E.E., Nikitina I.Y., Lyadova I.V. Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using microdroplets collected from exhaled air // *J. Breath Res.* 2018, V. 12: 036010.
104. Hochberg Y., Benjamini Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J. R. Stat. Soc. Series B. Stat. Methodol.* 1995. V. 57. P. 289-300.
105. Panteleev A.V., Nikitina I.Y., Burmistrova I.A., Kosmiadi G.A., Radaeva T.V., Amansahedov R.B., Sadikov P.V., Serdyuk Y.V., Larionova E.E., Bagdasarian T.R., Chernousova L.N., Ganusov V.V., Lyadova I.V. Severe tuberculosis in humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with antigen-specific CD4 T-cell response // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 963.

106. Nikitina I.Y., Kondratuk N.A., Kosmiadi G.A., Amansahedov R.B., Vasilyeva I.A., Ganusov V.V., Lyadova I.V. Mtb-Specific CD27 low CD4 T cells as markers of lung tissue destruction during pulmonary tuberculosis in humans // *PloS One* 2012. V. 7: e43733.
107. Schwarz K., Biller H., Windt H., Koch W., Hohlfeld J.M. Characterization of exhaled particles from the healthy human lung--a systematic analysis in relation to pulmonary function variables // *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2010. V. 23. P. 371-379.
108. Midulla F., Ratjen F. Special considerations for bronchoalveolar lavage in children // *Eur. Respir. Rev.* 1999. V. 9. P. 38-42.
109. Amin I., Idrees M., Awan Z., Shahid M., Afzal S., Hussain A. PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extrapulmonary tuberculosis // *BMC Res. Notes* 2011. V. 4. N.1. P. 332.
110. Ullah S., Sandqvist S., Beck O. Measurement of lung phosphatidylcholines in exhaled breath particles by a convenient collection procedure // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 11553-11560.
111. Bredberg A., Gobom J., Almstrand A.C., Larsson P., Blennow K., Olin A.C., Mirgorodskaya E. Exhaled endogenous particles contain lung proteins // *Clin. Chem.* 2012. V. 58. P. 431-440.
112. Kitova E.N., El-Hawiet F., Schnier P.D., Klassen J.S.J. Reliable determinations of protein-ligand interactions by direct ESI-MS measurements. Are we there yet? // *Am.Soc. Mass Spectrom.* 2012. V. 23. P. 431-441.
113. Thundat T., Warmack R.J., Allison D.P., Ferrell T.L. Electrostatic spraying of DNA molecules for investigation by scanning tunneling microscopy // *Ultramicroscopy* 1992. V. 42-44. P. 1083-108796.
114. Morozov V.N., Seeman N.C., Kallenbach N.R. New methods for depositing and imaging molecules in scanning tunneling microscopy // *Scanning Microsc.* 1993. V. 7. P. 757-779.
115. Hamann C., Woltmann R., Hong I. P., Hauptmann N., Karan S., Berndt R. Ultrahigh vacuum deposition of organic molecules by electrospray ionization // *Rev. Sci. Instrum.* 2011. V. 82. P. 033903.
116. Morozov V.N., Morozova T.Ya. Electrospray deposition as a method for mass fabrication of mono- and multicomponent microarrays of biological and biologically active substances // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 3110-3117.
117. Ouyang Z., Takáts Z., Blake T.A., Gologan B., Guymon A.J., Wiseman J.M., Oliver J.C., Davisson V.J., Cooks R.G. Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions // *Science* 2003. V. 301. P. 1351-1354.
118. Moerman R., Knoll J., Apetrei C., van den Doel L.R., van Dedem G.W.K. Quantitative analysis in nanoliter wells by prefilling of wells using electrospray deposition followed by sample introduction with a coverslip method // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 225-231.

119. Uematsu I., Matsumoto H., Morota K., Minagawa M., Tanioka A., Yamagata Y., Inoue K.J. Surface morphology and biological activity of protein thin films produced by electrospray deposition // *J. Colloid Interface Sci.* 2004. V. 269. P. 336-340.
120. Axelsson J., Hoberg A.M., Waterson C., Myatt P., Shield G.L., Varney J., Haddleton D.M., Derrick P.J. Improved Reproducibility and Increased Signal Intensity in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization as a Result of Electrospray Sample Preparation // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997. V. 11. P. 209.
121. Morozov V.N. Generation of biologically active nano-aerosol by an electrospray-neutralization method // *J. Aerosol Sci.* 2011. V. 42. P. 341-354.
122. Pasilis S.P., Kertesz V., Van Berkel G.J. Unexpected analyte oxidation during desorption electrospray ionization-mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 1208-1214.
123. Boys B.L., Kuprowski M.C., Noë J.J., Konermann L. Protein oxidative modifications during electrospray ionization: solution phase electrochemistry or corona discharge-induced radical attack? // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 4027-4034.
124. Banerjee S., Prakash H., Mazumdar S. Evidence of molecular fragmentation inside the charged droplets produced by electrospray process. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011. V. 22. P. 1707-1717.
125. Wang H., Ouyang Z., Xia Y. Peptide fragmentation during nanoelectrospray ionization // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 6534-6541.
126. Cheng X.D.G., Camp D.G., Wu Q., Bakhtiar R., Springer D.L., Morris B.J., Bruce J.E., Anderson G.A., Edmonds C.G., Smith R.D. Molecular weight determination of plasmid DNA using electrospray ionization mass spectrometry // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2183-2189.
127. Morozov V.N. Electrospray deposition of diomolecules // *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 2010. V. 119. P. 115-162.
128. Van Berkel G.J., McLuckey S.A., Glish G.L. Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 1586-1593.
129. Lastow O., Balachandran W. Numerical simulation of electrohydrodynamic (EHD) atomization // *J. Electrostat.* 2006. V. 64. P. 850-859.
130. Van Berkel G.J., Zhou F., Aronson J.T. Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* 1997. V. 162. P. 55-67.
131. Tang K., Gomez A.J. Generation of Monodisperse Water Droplets from Electrosprays in a Corona-Assisted Cone-Jet Mode // *J. Colloid Interface Sci.* 1995. V. 175. P. 326-332.114.
132. Berkout V.D., Doroshenko V.M. ECD-like peptide fragmentation at atmospheric pressure // *Int. J. Mass Spectrom.* 2012. V. 325-327. P. 113-120.
133. English W.N. Corona from a Water Drop // *Phys. Rev.* 1948. V. 74. P. 179-189.

134. Loeb L.B. *Electrical Coronas*; University of California Press: Berkley and Los Angeles, 1965. P. 248-298.
135. Dawson G.A. Pressure Dependence of WaterDrop Corona Onset and Its Atmospheric Importance // *Geophys. Res.* 1969. V. 74. P. 6859-6868.
136. Krasnov N.V., Muradimov M.Z., Shevchenko S.I. Complex study of electrodynamic spraying parameters of liquids // *Nauchnoe Priborostroenie (Rus)*. 1991. V. 1. P. 42-52.
137. Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases // *Anal. Biochem.* 1997. V. 253. P. 162-168.
138. Nelson D.P., Kiesow L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV) // *Anal. Biochem.* 1972. V. 49. P. 474-478.
139. Bader H., Hoigné J. Determination of Ozone in Water by the Indigo // *Water Res.* 1981. V. 15. P. 449-456.
140. Seixas de Melo J., Moura A.P., Melo M.J. Photophysical and Spectroscopic Studies of Indigo Derivatives in Their Keto and Leuco Forms // *J. Phys. Chem. A*. 2004. V. 108. P. 6975-6981.
141. Vartanian L.S., Gurevich S.M. Determination of superoxide dismutase activity in animal tissues by the means of nitroblue tetrazolium // *Vopr. Med. Khim.* 1982. V. 28. P. 23-26.
142. Cornelis J.F., Van Noordeen J.T., Vogels I.M.C. Cytophotometry of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual cells // *Histochem. J.* 1983. V. 15. P. 583-599.
143. Manevich Y., Held K.D., Biaglow J.E. Coumarin-3-carboxylic acid as a detector for hydroxyl radicals generated chemically and by gamma radiation // *Radiat. Res.* 1997. V. 148. P. 580-591.
144. Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Shlyapnikova E.A., Morozova T.Y., Morozov V.N. Are reactive oxygen species generated in electrospray in low currents? // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 1511-1517.
145. Jackson G.S., Enke C.G. Electrical equivalence of electrospray ionization with conducting and nonconducting needles // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 3777-3784.
146. Huang D., Chen Z.J. Reinvestigation of the Henry's law constant for hydrogen peroxide with temperature and acidity variation // *Environ. Sci.* 2010. V. 22. P. 570-574.
147. Stewart R.W. The annual cycle of hydrogen peroxide: is it an indicator of chemical instability? // *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* 2004. V. 4. P. 1941-1975.
148. Kettle A.J., Clark B.M., Winterbourn C.C. Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid: implications for the hypothesis that neutrophils produce ozon // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 18521-18525.
149. Bo Z., Yu K., Lu G., Mao S., Chen J., Fan F.G. Nanoscale discharge electrode for minimizing ozone emission from indoor corona devices // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 6337-6342.
150. Upadhyay L.S.B. Urease inhibitors: A review // *Indian J. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 381-388.

151. Krajewska B.J. Hydrogen peroxide-induced inactivation of urease. Mechanism, kinetics and inhibitory potency // *Mol. Catal. B.* 2011. V. 68. P. 262-269.
152. Ni C.H., Chen J N., Yang P.Y. Catalytic ozonation of 2-dichlorophenol by metallic ions // *Water Sci. Technol.* 2003. V. 47. P. 77-82.
153. Леванов А.В., Кусков И.В., Койайдарова К.Б., Зосимов А.В., Антипенко Э.Е., Лунин В.В. Катализ ионами металлов реакции озона с хлорид-ионами в кислой среде // *Кинетика и катализ* 2005. Т. 46. С. 138-143.
154. Xie J., Jiang J., Davoodi P., Srinivasan M.P., Wang C.-H. Electrohydrodynamic atomization: A two-decade effort to produce and process micro-/nanoparticulate materials // *Chem. Eng. Sci.* 2015. V. 125. P. 32-57.
155. Okubo Y., Ikemoto K., Koike K., Tsutsui C., Sakata I., Takei O., Adachi A., Sakai T. DNA introduction into living cells by water droplet impact with an electrospray process // *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 1429-1431.
156. Wu Y., Duong A., Lee L.J., Wyslouzil B.E. In the Delivery of Nanoparticles; Hashim A. A., Ed.; InTech: Croatia. 2012. P. 223-242.
157. Zeles-Hahn M.G., Lentz Y.K., Anchordoquy T J., Lengsfeld C.S. Effect of electrostatic spray on human pulmonary epithelial cells // *J. Electrostat.* 2011. V. 69. P. 67-77.
158. Morozov V.N., Kanev I.L. Knockdown of fruit flies by imidacloprid nanoaerosol // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. P. 12483-12489.
159. Lastow O., Balachandran W.J. Novel low voltage EHD spray nozzle for atomization of water in the cone jet mode // *J. Electrostat.* 2007. V. 65. P. 490-499.
160. Venter A., Sojka P.E., Cooks R.G. Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 8549-8555.
161. Olumee Z., Callahan J.H., Vertes A. Droplet Dynamics Changes in Electrostatic Sprays of Methanol–Water Mixtures // *J. Phys. Chem. A.* 1998. V. 102. P. 9154-9160.
162. Thundat T., Warmack R.J., Allison D.P., Ferrell T.L. Electrostatic spraying of DNA molecules for investigation by scanning tunneling microscopy // *Ultramicroscopy* 1992. V. 42–44. P. 1083-1087.
163. Doussineau T., Antoine R., Santacreu M., Dugourd P. Pushing the Limit of Infrared Multiphoton Dissociation to Megadalton-Size DNA Ion // *J. Phys. Chem. Lett.* 2012. V. 3. P. 2141-2145.
164. Mouradian S., Skogen J W., Dorman F.D., Zarrin F., Kaufman S.L., Smith L.M. DNA analysis using an electrospray scanning mobility particle sizer // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P 919-925.
165. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. P. 1102-1115.
166. Dizdaroglu M., Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA // *Free Radic. Res.* 2012. V. 46. P. 382-419.

167. Berg F., Wilken J., Helm C.A., Block S. AFM-based quantification of conformational changes in DNA caused by reactive oxygen species // *J. Phys. Chem. B*. 2015. V. 119. P. 25-32.
168. Nechipurenko D.Yu., Il'icheva I.A., Khodikov M.V., Poptsova M.S., Nechipurenko Yu.D., Grokhovsky S.L. Modeling of mechanochemical dna cleavage by action of ultrasound // *Biophysics* 2015. V. 59. P. 861-868.
169. Lentz Y.K., Worden L.R., Anchordoquy T.J., Lengsfeld C.S.J. Effect of jet nebulization on DNA: identifying the dominant degradation mechanism and mitigation methods // *Aerosol Sci.* 2005. V. 36. P. 973-990.
170. Hariadi R.F., Winfree E., Yurke B. Determining hydrodynamic forces in bursting bubbles using DNA nanotube mechanics // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. P. E6086-6095.
171. Lengsfeld C.S., Anchordoquy T.J. Shear-induced degradation of plasmid DNA // *J. Pharm. Sci.* 2002. V. 91. P. 1581-1589.
172. Bjerrum J., McReynolds J.P., Oppegard A.L., Parry R.W. Hexaminecobalt (III) salts // *Inorg. Synth.* 1946. V. 2. P. 216-221.
173. Davis L. G., Dibner M.D., Battey J.F. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier: New-York, Amsterdam, London. 1986.
174. Sheely M.L. Glycerol Viscosity Tables // *Ind. Eng. Chem.* 1932. V. 24. P. 1060-1064.
175. Widom J., Baldwin R.L. Monomolecular condensation of lambda-DNA induced by cobalt hexamine // *Biopolymers* 1983. V. 22. P. 1595-1620.
176. Williams M.C., Rouzina I., McCauley M.J. Peeling back the mystery of DNA overstretching. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. P. 18047-18048.
177. Li D., Ji B. Predicted rupture force of a single molecular bond becomes rate independent at ultralow loading rates // *Phys. Rev. Lett.* 2014. V. 112. P. 0783021-0783025.
178. Bowman R.D., Davidson N. Hydrodynamic shear breakage of DNA // *Biopolymers* 1972. V. 11. P. 2601-2624.
179. Ladoux B., Doyle P.S. Stretching tethered DNA chains in shear flow // *Europhys. Lett.* 2000. V. 52. P. 511-517.
180. Bullerjahn J. T., Sturm S., Kroy K. Theory of rapid force spectroscopy // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. Article no. 4463.
181. Bensimon D., Simon A.J., Croquette V., Bensimon A. Stretching DNA with a receding meniscus: Experiments and models // *Phys. Rev. Lett.* 1995. V. 74. P. 4754-4757.
182. Hogan C.J., Jr., Kettleson E.M., Ramaswami B., Chen D. R., Biswas P. Charge reduced electrospray size spectrometry of mega- and gigadalton complexes: whole viruses and virus fragments // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 844-852.

183. Niemz A., Ferguson T.M., Boyle D.S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious disease // Trends in Biotechnol. 2011. V. 29. P. 240-250.
184. Kaltenboeck B., Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics // Adv. Clin. Chem. 2005. V. 40. P. 219-259.
185. Valones M.A.A., Guimaraes R.L., Brandao L.A.C., de Souza P.R., de Albuquerque Tavares Carvalho A., Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review // Braz. J. Microbiol. 2009. V. 40. P. 1-11.
186. Yang S., Rothman R.E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings // Lancet Infect. Dis. 2004. V. 4. P. 337-348.
187. Gavrilov A.A., Chetverina H.V., Chermnykh E.S., Razin S.V., Chetverin A.B. Quantitative analysis of genomic element interactions by molecular colony technique // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42: e36.
188. Bustin S.A. How to speed up the polymerase chain reaction // Biomol. Detect. Quantif. 2017. V. 12. P. 10-14.
189. Acinas S.G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V., Polz M.F. PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 8966-8969.
190. Ragoussis J. Genotyping technologies for genetic research // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2009. V. 10. P. 117-133.
191. Sharafdarkolaei H.S., Motovali-Bashi M., Gill P. Fluorescent detection of point mutation via ligase reaction assisted by quantum dots and magnetic nanoparticle-based probes // RSC Adv. 2017. V. 7. P. 25665-25672.
192. Weizmann Y., Patolsky F., Willner I. Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on Au-nanoparticles. // Analyst. 2001. V. 126. P. 1502.
193. Das J., Ivanov I., Sargent E.H., Kelley Sh.O. Clutch Probes for Circulating Tumor DNA Analysis // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. P. 11009-11016.
194. Huang H., Bai W., Dong C., Guo R., Liu Z. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus.// Biosens. Bioelectron. 2015. V. 68 P. 442-446.
195. Cai S., Xin L., Lau C., Lu J., Zhang X. Ultrasensitive and Selective DNA Detection by Hydroxylamine Assisted Gold Nanoparticle // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 6120-6122.
196. Rochelet-Dequaire M., Limoges B., Brossier P. Subfemtomolar electrochemical detection of target DNA by catalytic enlargement of the hybridized gold nanoparticle labels // Analyst 2006. V. 131. P. 923-929.

197. Li D., Yan Y., Wieckowska A., Willner, I. Amplified electrochemical detection of DNA through the aggregation of Au nanoparticles on electrodes and the incorporation of methylene blue into the DNA-crosslinked structure // *Chem. Commun.* 2007. V. 34. P. 3544-3546.
198. Seefeld T.H., Zhou W.-J., Corn R.M. Rapid Microarray Detection of DNA and Proteins in Microliter Volumes with SPR Imaging Measurements // *Langmuir* 2011. V. 27. P. 6534-6540.
199. Willner I., Patolsky F., Weizmann Y., Willner B. Amplified detection of single-base mismatches in DNA using microgravimetric quartz-crystal-microbalance transduction // *Talanta* 2002. V. 56. P. 847-856.
200. Wang W., Yuan X.Q., Liu X.H., Gao Q., Qi H.L., Zhang C.X. Selective DNA detection at zeptomole level based on coulometric measurement of gold nanoparticle-mediated electron transfer across a self-assembled monolayer // *Sci. China Chem.* 2013. V. 56. P. 1009-1016.
201. Cannon B., Campos A.R., Lewitz Z., Willets K.A., Russell R. Zeptomole detection of DNA nanoparticles by single-molecule fluorescence with magnetic field-directed localization // *Anal. Biochem.* 2012. V. 431.P. 40-47.
202. Anazawa T., Matsunaga H., Yeung E.S. Electrophoretic quantitation of nucleic acids without amplification by single-molecule imaging // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 5033-5038.
203. Mayr R., Haider M., Thünauer R., Haselgrübler T., Schütz G.J., Sonnleitner A., Hesse J. A microfluidic platform for transcription-and amplification-free detection of zepto-mole amounts of nucleic acid molecules // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 78. P. 1-6.
204. Li L., Li X., Li L., Wang J., Jin W. Ultra-sensitive DNA assay based on single-molecule detection coupled with fluorescent quantum dot-labeling and its application to determination of messenger RNA // *Anal. Chim. Acta* 2011. V. 685. P. 52-57.
205. Esfandiari L., Lorenzini M., Kocharyan G., Monbouquette H.G., Schmidt J.J. Sequence-Specific DNA Detection at 10 fM by Electromechanical Signal Transduction // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 9638-9643.
206. Hesse J., Jacak J., Kasper M., Regl G., Eichberger T., Winklmayr, et al. RNA expression profiling at the single molecule level // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 1041-1045.
207. Van den Wildenberg S.M.J.L., Prevo B., Peterman E.J.G. A Brief Introduction to Single-Molecule Fluorescence Methods // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1665. P. 93-113.
208. Mulvaney S.P., Ibe C.N., Tamanaha C.R., Whitman L.J. Direct detection of genomic DNA with fluidic force discrimination assays // *Anal. Biochem.* 2009. V. 392. P. 139-144.
209. Shlyapnikov Y.M., Shlyapnikova E.A., Morozova T.Ya., Beletsky I.P., Morozov V.N. The detection of the microarray-hybridized oligonucleotides with magnetic beads // *Anal. Biochem.* 2010. V. 399. P. 125-131.
210. Keller G.H. // *DNA Probes: Molecular Hybridization Technology.* Stockton Press. 1993. P. 1-25.
211. Dupuis N.F., Holmstrom E.D., Nesbitt D.J. Single-molecule kinetics reveal cation-promoted DNA duplex formation through ordering of single-stranded helices // *Biophys. J.* 2013. V. 105. P. 756-766.

212. Gao Y., Wolf L.K., Georgiadis R.M. Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 3370-3377.
213. Levicky R., Horgan A. Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 143-149.
214. Srisa-Art M., Dyson E.C., de Mello A.J., Edel J.B. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 7063-7067.
215. Sheehan P.E., Whitman L.J. Detection Limits for Nanoscale Biosensors // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 803-807.
216. Ho D., Zimmermann J.L., Dehmelt F.A., Steinbach U., Erdmann M., Severin P., Falter K., Gaub H.E. Force-driven separation of short double-stranded DNA // *Biophys. J.* 2009. V. 97. P. 3158-3167.
217. Chen C., Wang W., Ge J., Zhao X.S. Kinetics and thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 3756-3765.
218. Howley P.M., Israel M.A., Law M.F., Martin M.A. A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 4876-4883.
219. Clerc O., Greub G. Routine use of point-of-care tests: usefulness and application in clinical microbiology // *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. V. 16. P. 1054-1061.
220. Uhlig M.R., Amo C.A., Garcia R. Dynamics of breaking intermolecular bonds in high-speed force spectroscopy // *Nanoscale* 2018. V. 10. P. 17112-17116.
221. Heller M.J., Forster A.H., Tu E. Active microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications // *J. Electrophor.* 2000. V. 21. P. 157-164.
222. Gantelius J., Hartmann, M., Schwenk J.M., Roeraade J., Andersson-Svahn H., Joos T.O. Magnetic bead-based detection of autoimmune responses using protein microarrays // *N. Biotechnol.* 2009. V. 26. P. 269-276.
223. Lee G.U., Metzger S., Natesan M., Yanavich C., Dufrene Y.F. Implementation of Force Differentiation in the Immunoassay // *Anal. Biochem.* 2000. V. 287. P. 261-271.
224. Shang H., Kirkham P.M., Myers T.M., Cassell G.H. Lee G.U. The application of magnetic force differentiation for the measurement of the affinity of peptide libraries // *J. Magn. Magn. Mater.* 2005. V. 293. P. 382-388.
225. Chemla Y.R., Grossman H.L., Poon Y. McDermott R., Stevensi R., Alper M.D., Clarke J. Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. V. 97. P. 14268-14272.

226. Grossman H.L., Myers W.R., Vreeland V.J., Bruehl R., Alper M.D., Bertozzi C.R., Clarke J. Detection of bacteria in suspension by using a superconducting quantum interference device // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. P. 129-134.
227. Yang S.Y., Chieh J.J., Wang W.C., Yu C.Y., Lan C.B., Chen J.H., et al. Ultra-highly sensitive and wash-free bio-detection of H5N1 virus by immunomagnetic reduction assays // *J. Virol. Methods.* 2008. V. 153. P. 250-252.
228. Tamanaha C.R., Mulvaney S.P., Rife J.C., Whitman L.J. Magnetic labeling, detection, and system integration // *Biosens. Bioelectron.* 2008. V. 24. P. 1-13.
229. Gijs M.A.M., Lacharme F., Lehmann U. *Microfluidic Applications of Magnetic Particles*
230. Sperling L.H. *Introduction to Physical Polymer Science* (4th ed.). 2006. Bethlehem, PA: John Wiley & Sons.
231. Peppas N.A., Merrill E.W. Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks // *J. Appl. Polym. Sci.* 1977. V. 21. P. 1763-1770.
232. Botin A.S., Morozov V.N. Transfer of low-molecular weight compounds through protein crystals and films // *Biofizika* 1987. V. 32. P. 26-31.
233. Laitinen O.H., Hytönen V.P., Ahlroth M.K., Pentikäinen O.T., Gallagher C., Nordlund H.R., et al. Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin // *Biochem. J.* 2002. V. 363. P. 609-617.
234. Hoggard J.D., Sides P.J., Prieve D.C. Measurement of the Streaming Potential and Streaming Current near a Rotating Disk to Determine Its Zeta Potential // *Langmuir* 2005. V. 21. P. 7433-7438.
235. Sides P. J.; Hoggard J. D. Measurement of the Zeta Potential of Planar Solid Surfaces by Means of a Rotating Disk // *Langmuir* 2004. V. 20. P. 11493–11498.
236. Shlyapnikov Yu.M., Shlyapnikova E.A., Morozov V.N. Carboxymethyl cellulose film as a substrate for microarray fabrication // *Anal. Chem.* 2014. V.86. P. 2082-2089.
237. Lindeberg T. *Scale-Space Theory in Computer Vision*. Springer: New York. 1994.
238. Notley S.M., Erikson M., Wagberg L., Beck S., Grey D.G. Surface forces measurements of spin-coated cellulose thin films with different crystallinity // *Langmuir* 2006. V. 22. P. 3154-3160.
239. Gohil J.M., Bhattacharya A., Ray P. Studies on the Cross-linking of Poly (Vinyl Alcohol) // *J. Pol. Res.* 2006. V. 13. P. 161-169.
240. Morozov V.N., Evanskey M., Tan Y.K., Shaffer D., Morozova T.Y., Bailey C. Ultra-filtration membrane for electrophoretic capturing of pathogens for AFM imaging // *Langmuir* 2006. V. 22. P. 1742-1748.
241. Derjaguin B.V. Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion, IV. Theorie des Anhaftens kleiner Teilchen // *Kolloid Z.* 1934. V. 69. P. 155-164.

242. Russel W.B., Saville D.A., Schowalter W.R. Colloidal Dispersions; Cambridge University Press: Cambridge. 1989.
243. Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. Высшая школа: Москва. 2004.
244. Cretich M., Damin F., Chiari M. Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics? // *Analyst* 2014. V. 139. P. 528-542.
245. Golden J.P., Floyd-Smith T.M., Mott D.R., Ligler F.S. Target delivery in a microfluidic immunosensor // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. P. 2763-2767.
246. Rupp J., Schmidt M., Münch S., Cavalari M., Steller U., Steigert J., et al. Rapid microarray processing using a disposable hybridization chamber with an integrated micropump // *Lab. Chip* 2012. V. 12. P. 1384-1388.
247. Stern D., Olson V.A., Smith S.K., Pietraszczyk M., Miller L., Miethe P., et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration // *Viol. J.* 2016. V. 13. N.1. P. 207.
248. Byzova N., Vinogradova S., Porotikova E., Terekhova U., Zherdev A., Dzantiev B. Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus // *Biosensors* 2018. V. 8. P. 111.
249. Wu Z., Hu J., Zeng T., Zhang Z.-L., Chen J., Wong G., et al. Ultrasensitive Ebola Virus Detection Based on Electroluminescent Nanospheres and Immunomagnetic Separation // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 2039-2048.
250. Wu Z., Zeng T., Guo W.-J., Bai Y.-Y., Pang D.-W., Zhang Z.-L. Digital Single Virus Immunoassay for Ultrasensitive Multiplex Avian Influenza Virus Detection Based on Fluorescent Magnetic Multifunctional Nanospheres // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019. V. 11. P. 5762-5770.
251. Li J., Zrazhevskiy P., Gao X. Eliminating size-associated diffusion constraints for rapid on-surface bioassays with nanoparticles probes // *Small* 2016. V. 12. P. 1035-1043.
252. Hook A.L., Voelcker N.H., Thissen H. Plasma polymer and PEG-based coatings for DNA, protein and cell microarrays. // *Meth. Mol. Biol.* 2010. V. 706. P. 159-170.
253. Feng H., Zhang Q., Ma H., Zheng B. An ultralow background substrate for protein microarray technology // *Analyst* 2015. V. 140. P. 5627-5633.
254. Liu Q., Zhou X., Wu H., Zheng B. Blocking-free and self-contained immunoassay platform for one-step point-of-care testing // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 165. P. 112394.
255. Frotscher E., Danielczak B., Vargas C., Meister A., Durand G., Keller S. A Fluorinated Detergent for Membrane-Protein Applications // *Ang. Chem. Int. Edit.* 2015. V. 54. P. 5069-5073.
256. Schweikl H., Hiller K.-A., Car, U., Schweiger R., Eidt A., Ruhl S., Muller R., Schmalz G. Salivary protein adsorption and *Streptococcus gordonii* adhesion to dental material surfaces // *Dent. Mater.* 2013. V. 29. P. 1080-1089.

257. Martins V C., Cardoso F.A., Freitas P.P., Fonseca L.P. Picomolar Detection Limit on a Magnetoresistive Biochip After Optimization of a Thiol-Gold Based Surface Chemistry // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010. V. 10. P. 5994-6002.
258. Hsieh H.-Y., Wang P.-C., Wu C.-L., Huang C.-W., Chieng C.-C., Tseng F.-G. Effective Enhancement of Fluorescence Detection Efficiency in Protein Microarray Assays: Application of a Highly Fluorinated Organosilane as the Blocking Agent on the Background Surface by a Facile Vapor-Phase Deposition Process // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 7908-7916.
259. Sun Z., Cheng K., Yao Y., Wu F., Fung J., Chen H., et al. Controlled Nano-Bio Interface of Functional Nanoprobes for in Vivo Monitoring Enzyme Activity in Tumors // *ACS Nano* 2019. V. 13. P. 1153-1167.
260. Cheng N., Cao X. Photoactive SAM surface for control of cell attachment // *J. Colloid Interface Sci.* 2010. V. 348. P. 71-79.
261. Kakiyama T., Usui K., Tomizaki K., Mie M., Kobatake E., Mihara H. A peptide release system using a photo-cleavable linker in a cell array format for cell-toxicity analysis // *Polym. J.* 2013. V. 45. P. 535-539.
262. Dettin M., Muncan N., Bugatti A., Grezzo F., Danesin R., Rusnati M. Chemoselective Surface Immobilization of Proteins through a Cleavable Peptide // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. P. 1753-1757.
263. Lietard J., Kretschy N., Sack M., Wahba A.S., Somoza M.M., Damha M.J. Base-cleavable microarrays for the characterization of DNA and RNA oligonucleotides synthesized in situ by photolithography // *Chem. Commun.* 2014. V. 50. P. 12903-12906.
264. Bi B., Huang R.Y.-C., Maurer K., Chen C., Moeller K.D. Site-Selective, Cleavable Linkers: Quality Control and the Characterization of Small Molecules on Microelectrode Arrays // *J. Org. Chem.* 2011. V. 76. P. 9053-9059.
265. Zhen G., Egli V., Vörös J., Zammaretti P., Textor M., Glockshuber R., Kuennemann E. Immobilization of the Enzyme β -Lactamase on Biotin-Derivatized Poly(l-lysine)-g-poly (ethylene glycol)-Coated Sensor Chips: A Study on Oriented Attachment and Surface Activity by Enzyme Kinetics and in Situ Optical Sensing // *Langmuir* 2004. V. 20. P. 10464-10473.
266. Chen H.-H., Hsiao Y.-C., Li J.-R., Chen S.-H. In situ fabrication of cleavable peptide arrays on polydimethylsiloxane and applications for kinase activity assays // *Anal. Chim. Acta* 2015. V. 865. P. 53-59.
267. Huang Q., Bao C., Lin Y., Chen J., Liu Z., Zhu L. Disulfide-phenylazide: a reductively cleavable photoreactive linker for facile modification of nanoparticle surfaces // *J. Mater. Chem. B.* 2013. V. 1. P. 1125.
268. Schnaar R.L., Langer B.G., Brandley B.K. Reversible covalent immobilization of ligands and proteins on polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1985. V. 151. P. 268-281.
269. Caulum M.M., Murphy B.M., Ramsay L.M., Henry C.S. Detection of Cardiac Biomarkers Using Micellar Electrokinetic Chromatography and a Cleavable Tag Immunoassay // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 5249-5256.

270. Johnson L., Gupta A.K., Ghafoor A., Akin D., Bashir R. Characterization of vaccinia virus particles using microscale silicon cantilever resonators and atomic force microscopy // *Sens. Actuat. B. Chem.* 2006. V. 115. P. 189-197.
271. Lin Y.-S., Lagen M.T., Newcomb J.R., Rogers T J. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for staphylococcal enterotoxin B // *J. Med. Microbiol.* 1988. V. 27. P. 263-270.
272. Khlebnikova T.S., Piven' Y.A., Isakova V.G., Lakhvich F.A. 2-perfluoroalkanoylcyclopentane-1,3-diones. Synthesis and some transformations // *Russ. J. Org. Chem.* 2012. V. 48. P. 1277-1282.
273. Fu W., Carbrello C., Wu X., Zhang W. Visualizing and quantifying the nanoscale hydrophobicity and chemical distribution of surface modified polyethersulfone (PES) membranes // *Nanoscale* 2017. V. 9. P. 15550-15557.
274. Smith M.B. Functional Group Exchange Reactions. // In book *Organic Synth.* 2017. P. 185-213.
- 275 258. Moroder L. Chemistry of Peptide Synthesis // *ChemBioChem.* 2006. V. 7. P. 551.
276. Shlyapnikov Yu.M., Malakhova E. A., Shlyapnikova E.A. Rapid Amplification-Free Microarray-Based Ultrasensitive Detection of DNA // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 11209-11214.
277. Bagioni S., Sisto R., Ferraro A., Caiafa P., Turano C. A new method for the preparation of DNA-cellulos. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 89. P. 616-619.
278. Wellhausen R., Seitz H. Facing Current Quantification Challenges in Protein Microarrays // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 1-8.
279. Karyakin A.A., Presnova G.V., Rubtsova M.Y., Egorov A.M. Oriented Immobilization of Antibodies onto the Gold Surfaces via Their Native Thiol Groups // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 3805-3811.
280. Sheehan P. E., Whitman L.J. Detection Limits for Nanoscale Biosensors // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 803-807.
281. Ahluwalia A., De Rossi D., Ristori C., Schirone A., Serra G. A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors // *Biosens. Bioelectron.* 1992. V. 7. P. 207-214.
282. Stenberg M., Stibler L., Nygren H.J. External diffusion in solid-phase immunoassays // *Theor. Biol.* 1986. V. 120. P. 129-140.
283. Canziani G.A., Klakamp S., Myszka D.G. Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 301-307.
284. Pappaert K., Ottevaere H., Thienpont H., Van Hummelen P., Desmet G. Diffusion limitation: a possible source for the occurrence of doughnut patterns on DNA microarrays // *Bio Techniques.* 2006. V. 41. P. 609-616.
285. Emerson G.L., Nordhausen R., Garner M.M., Huckabee J.R., Johnson, S., Wohrle R.D., et al. Novel Poxvirus in Big Brown Bats, Northwestern United States // *Emerg. Infect. Dis.* 2013. V. 19. P. 1002-1004.
286. Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Shlyapnikova E.A. Rapid ultrasensitive gel-free immunoblotting with magnetic labels // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 4146-4153.

287. Halabi S., Yang Q. Carmack A., Zhang S., Foo W.C., Eisen T. et al. Tissue based biomarkers in non-clear cell RCC: Correlative analysis from the ASPEN clinical trial // *Kidney Cancer J.* 2021. V. 19. P. 64-72.
288. Gulati S.; Vogelzang N.J. Biomarkers in renal cell carcinoma: Are we there yet? // *Asian J. Urol.* 2021. V. 8. P. 362-375.
289. Shi L.; Wang M.; Li H.; You P. MicroRNAs in body fluids: a more promising biomarker for clear cell renal cell carcinoma // *Cancer Manag. Res.* 2021. V. 13. P. 7663-7675.
290. Junker K.; Zeuschner P. Personalised medicine in renal cell tumours // *Aktuelle Urol.* 2019. V.50. P. 513-523.
291. Patel S.H.; Singla N.; Pierorazio P.M. Decision-making in active surveillance in kidney cancer: current trends and future urine and tissue markers // *World J. Urol.* 2021. V. 39. P. 2869-2874.
292. Baldin A.V.; Grishina A.N.; Korolev D.O.; Kuznetsova E.B; Golovastova M.O.; Kalpinskiy A. S., et al. Autoantibody against arrestin-1 as a potential biomarker of renal cell carcinoma.// *Biochimie* 2019. V. 157. P. 26–37.
293. Dakubo G.D. *Cancer Biomarkers in Body Fluids (Biomarkers in Proximal Fluids)*. 2019. ISBN: 978-3-030-24723-2.
294. Flitcroft, J.G.; Verheyen, J., Vemulkar, T.; Welbourne, E.N.; Rossi, S.H.; Welsh, S.J.; Cowburn, R.P.; Stewart, G.D. Early detection of kidney cancer using urinary proteins: a truly non-invasive strategy // *BJU Int.* 2021.
295. Morrissey J.J., London A.N., Luo J., Kharasch E.D. Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer // *Mayo Clin. Proc.* 2010. V. 85. P. 413–421.
296. Morrissey J.J., Mellnick V.M., Luo J., et al. Evaluation of urine aquaporin-1 and perilipin-2 concentrations as biomarkers to screen for renal cell carcinoma: a prospective cohort study // *JAMA Oncol.* 2015. V. 1. P. 204-212.
297. Hu R., Gupta R., Wang Z., Wang C., Sun H., Singamaneni S., Kharasch E.D., Morrissey J.J. Bioplasmonic paper-based assay for perilipin-2 non-invasively detects renal cancer // *Kidney Int.* 2019. V. 96. P. 1417–1421
298. Papale M., Vocino G., Lucarelli G., Rutigliano M., Gigante M., Rocchetti M. T., et al. Urinary RKIP/p-RKIP is a potential diagnostic and prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma // *Oncotarget* 2017. V. 8. P. 40412-40424.
299. Meo A, Batruch I, Brown M.D., Yang C., Finelli A. Jewett, M.A., Diamandis, E.P., Yousef G.M. Searching for prognostic biomarkers for small renal masses in the urinary proteome // *Int. J. Cancer.* 2020. V.146. P. 2315–2325.

300. Shlyapnikov Y.M., Malakhova E.A., Vinarov A.Z., Zamyatnin A.A., Shlyapnikova E.A. Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 7. P. 620687.
301. Golovastova M.O., Tsoy L.V., Bocharnikova A.V., Korolev D.O., Gancharova O.S., Alekseeva E.A., et al. The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors // *Tumour Biol.* 2016. V. 37. P. 9899-9907.
302. Chen H., Werner S., Tao S., Zornig I., Brenner H. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer // *Cancer Lett.* 2014. V.346. P. 178–187.
303. Savchenko M.S., Goncharskaia M.A., Skorikova E.E., Eichmuller S.B., Kushlinsky N.E., Bazhin A.V., et al. Autoantibodies against the Ca (2+)-binding protein recoverin in blood sera of patients with various oncological diseases // *Oncol. Lett.* 2012. V. 3. P. 377–382.
304. Bazhin A.; Dalke C.; Willner N.; Abschutz O.; Wildberger H., Philippov P., et al. Cancer-retina antigens as potential paraneoplastic antigens in melanoma associated retinopathy // *Int. J. Cancer* 2009. V. 124. P. 140149.
305. Potter M. J., Adamus G., Szabo S.M., Lee R., Mohaseb K., Behn D. Autoantibodies to transducin in a patient with melanoma associated retinopathy // *Am. J. Ophthalmol.* 2002. V. 134. P. 128130.
306. Batista R., Vinagre N., Meireles S., Vinagre J., Prazeres H., Leão R., et al. Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: a comprehensive review // *Diagnostics (Basel)* 2020. V. 10. P. 39.
307. Faiena I., Rosser C.J., Chamie K., Furuya H. Diagnostic biomarkers in non-muscle invasive bladder cancer // *World J. Urol.* 2019. V. 37. P. 2009-2016.
308. Matuszczak M., Salagierski M. Diagnostic and Prognostic Potential of Biomarkers CYFRA 21.1, ERCC1, p53, FGFR3 and TATI in Bladder Cancers // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3360.
309. Carando R., Ludovico G.M., Zazzara M., Zamboni S., Afferi L., Simeone C., et al. Precision medicine in localized bladder cancer: Personalizing therapies to improve outcomes // *Arch. Esp. Urol.* 2021. V. 73. № 10. P. 1016-1022.
310. Liang Z., Zhang Q., Wang C., Shi F., Cao H., Yu Y., et al. Hyaluronic acid/ Hyaluronidase as biomarkers for bladder cancer: a diagnostic meta-analysis // *Neoplasms.* 2017. V. 64. P. 901-908.
311. Ecke T.H., Weiß S., Stephan C., Hallmann S., Barski D., Otto T., et al. UBC® Rapid Test for detection of carcinoma in situ for bladder cancer // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. № 5. P. 1010428317701624.
312. Gleichenhagen J., Arnd C., Casjens S., Meinig C., Gerullis H., Raiko I., et al. Evaluation of a new survivin ELISA and UBC® Rapid for the detection of bladder cancer in urine // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 226.
313. Li F., Yu Z., Chen P., Lin G., Li T., Hou L., et al. The increased excretion of urinary orosomucoid 1 as a useful biomarker for bladder cancer // *Am. J. Cancer Res.* 2016. V. 6. P. 331-340.

314. Srivastava A.K., Singh P.K., Singh D., Dalela D., Rath S.K., Bhatt M.L. Clinical utility of urinary soluble Fas in screening for bladder cancer // *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 2014. V. 12: e215.
315. Lorenzi T., Lorenzi M., Altobelli E., Marzioni D., Mensà E., Quaranta A., et al. HtrA1 in human urothelial bladder cancer: a secreted protein and a potential novel biomarker // *Int. J. Cancer* 2013. V. 133. P. 2650-2661.
316. Liu W., Woolbright B.L., Pirani K., Didde R., Abbott E., Kaushik G., et al. Tumor M2-PK: A novel urine marker of bladder cancer // *PLoS One* 2019. V. 14: e0218737.
317. Bhagirath D., Abrol N., Khan R., Sharma M., Seth A., Snarma A. Expression of CD147, BIGH3 and Stathmin and their potential role as diagnostic marker in patients with urothelial carcinoma of the bladder // *Clin. Chim. Acta* 2012. V. 413. P. 1641-1646.
318. Urquidi V., Kim J., Chang M., Dai Y., Rosser C.J., Goodison S. CCL18 in a multiplex urine-based assay for the detection of bladder cancer // *PLoS One* 2012. V. 7: e37797.
319. Kumar P., Nandi S., Tan T.Z., Ler S.G., Chia K.S., Lim W.Y., et al. Highly sensitive and specific novel biomarkers for the diagnosis of transitional bladder carcinoma // *Oncotarget* 2015. V. 6, P. 13539-13549.
320. Furuya H., Tabula L., Lee R., Kralovec P., Ramsden M., Wong R., Rosser C.J. Analytical validation of ONCURIA™ a multiplex bead-based immunoassay for the non-invasive bladder cancer detection // *Pract. Lab. Med.* 2020. V. 22: e00189.
321. Goodison S., Chang M., Dai Y., Urquidi V., Rosser C.J. A multi analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer // *PLoS One* 2012. V. 7: e47469.
322. Koo K.M., Mainwaring P.N., Tomlin, S.A., Trau M. Merging new-age biomarkers and nanodiagnostics for precision prostate cancer management // *Nat. Rev. Urol.*, 2019. V. 16. P. 302-317.
323. Fujita K., Nonomura N. Urinary biomarkers of prostate cancer // *Int. J. Urol.* 2018. V. 25, 770–779.
324. Hendriks R.J., van Oort I.M., Schalken J.A. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: A review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017. V. 20. P. 12–19.
325. Cooperberg M.R., Carroll P.R., Dall’Era M.A., Davies B.J., Davis J.W., Eggener S.E., et al. The State of the Science on Prostate Cancer Biomarkers: The San Francisco Consensus Statement // *Eur. Urol.* 2019. V. 76. P. 268–272.
326. Salciccia S., Capriotti A.L., Laganà A., Fais S., Logozzi M., De Berardinis, et al. Biomarkers in Prostate Cancer Diagnosis: From Current Knowledge to the Role of Metabolomics and Exosomes // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 4367.
327. Luo Y., Gou X., Huang P., Mou C. Prostate cancer antigen 3 test for prostate biopsy decision: A systematic review and meta-analysis // *Chin. Med. J. (Engl).* 2014. V. 127. P. 1768–1774.

328. Van Neste L., Hendriks R.J., Dijkstra S., Trooskens G., Cornel E.B., Jannink S.A., et al. Detection of high-grade prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score // *Eur. Urol.* 2016. V. 70. P. 740–748.
329. Donova M.J., Noerholm M., Bentink S., Belzer S., Skog J., O’Neil, V., Cochran J.S., Brown G.A. A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2015. V. 18. P. 370–375.
330. Hanley J. A., McNeil B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve // *Radiology* 1982. V. 143. P. 29-36.
331. Matsuo S., Ohguro H., Ohguro I., Nakazawa M. Clinicopathological roles of aberrantly expressed recoverin in malignant tumour cells // *Ophthalmic Res.* 2010. V. 43. P. 139-144.
332. Ohguro H., Odagiri H., Miyagawa Y., Ohguro I., Sasak M., et al. Clinicopathological features of gastric cancer cases and aberrantly expressed recoverin // *Tohoku J. Exp. Med.* 2004. V. 202. P. 213-219.
333. Závada J., Zavadová Z., Zat’ovičová M., Hyršl L., Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients // *Br. J. Cancer* 2003. V. 89. P. 1067-1071.
334. Дехал П. Система магнитного распознавания. // Патент RU 2442169C2 от 10.12.2010.
335. Кох Х. и др. Устройство для высокочувствительной магнитной детекции аналитов // Патент RU 2217751C2 от 9.10.2000.
336. Осин Н.С. Способ многоаналитного иммуноанализа с использованием // Патент 2370601 от 20.01.2010.
337. Morozov V.N., Morozova T.Ya. Methods and devices for active bioassay // US Patent 7,960,184.
338. Morozov V., Bailey C., Evanskey M. Analyte detection using an active assay // US 7,824,927 B2 от 2.10. 2010.
339. Griese M., Noss J., Bredow C. Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva // *Proteomics* 2002. V. 2. P. 690-696.
340. Koopmans M.P.G., von Bonsdorff C.H., Vinje J., De Medici D., Monroe S.S. Foodborne viruses // *FEMS Microbiol. Rev.* 2002. V. 26. P. 187-205.
341. Brinkman R., Van Seinfoorn J. Ultrafiltration and concentration by ultrafiltration by a centrifuge method // *Biochem. J.* 1936. V. 30. P. 1523-1525.
342. Degerli N., Akpınar A. A novel concentration method for concentrating solutions of protein extracts based on dialysis techniques // *Anal. Biochem.* 2000. V. 297. P. 192-194.
343. Saul A., Don M. A rapid method of concentrating proteins in small volumes with high recovery using Sephadex G-25 // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138. P. 451-453.
344. Curtain C. Concentrating protein solutions // *Nature* 1964. V. 203. P. 1380.
345. Vartak H.G., Rele M.V., Rao M., Deshpav V.V. A method for concentrating dilute solutions of macromolecules // *Anal. Biochem.* 1983. V. 133. P. 260-263.

346. Chin C.C., Dence J.B., Warren J.C.J. Crystallization of human placental estradiol 17 β -dehydrogenase. A new method for crystallizing labile enzymes // *Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 3700-3705.
347. Stokke B.T., Mikkelsen A., Algsaeter A. An electrophoretic device concentrating charged macromolecules to a predetermined final solution volume // *Anal. Biochem.* 1985. V. 148. P. 527-532.
348. Ohyama T. An ultrarapid method for the recovery of DNA from gels // *Anal. Biochem.* 1993. V. 208. P. 209-211.
349. Cole K.D. An apparatus for electrophoretic capture and recovery of circular DNA in thin layers // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003. V. 37. P. 251-257.
350. Lee J.H., Song Y.A., Tannenbaum S.R., Han J. Increase of reaction rate and sensitivity of low-abundance enzyme assay using micro/nanofluidic preconcentration chip // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 3198-3204.
351. Khandurina J., Jacobson S.C., Waters L.C., Foote R.S., Ramsey J.M. Microfabricated porous membrane structure for sample concentration and electrophoretic analysis // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 1815-1819.
352. Song S., Singh A.K., Kirby B.J. Electrophoretic concentration of proteins at laser-patterned nanoporous membranes in microchips // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 4589-4592.
353. Foote R.S., Khandurina J., Jacobson S.C., Ramsey J.M. Preconcentration of proteins on microfluidic devices using porous silica membranes // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 57-63.
354. Rhodes D.G., Yphantis D.A. A small-volume electrophoretic concentrator // *Anal. Biochem.* 1981. V. 116. P. 379-382.
355. Salmon E.D., Saxton W.M., Leslie, R.J., Karow M.L., McIntosh J R. Diffusion coefficient of fluorescein-labeled tubulin in the cytoplasm of embryonic cells of a sea urchin: video image analysis of fluorescence redistribution after photobleaching // *J. Cell Biol.* 1984. V. 99. P. 2157-2164.
356. Washburn E.W. *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology* // McGraw-Hill: New York. 1929.
357. Tanaka Y. *Ion Exchange Membranes: Fundamentals and Applications* // Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 2007.
358. Espins V., Mehta A.L., Winters M.E., Calvert V., Wulfkuhle J., Petricoin E.F., Liotta L.A. Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens // *Proteomics* 2003. V. 3. P. 2091-2100.

359. Jackson A.S., Sandrini A., Campbell C., Chow S., Thomas P.S., Yates D.H. Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007. V. 175. P. 222-227.
360. Dwyer T.M. Sampling airway surface liquid: non-volatiles in the exhaled breath condensate // *Lung* 2004.V. 182. P. 241-250.
361. Rosias P.P., Robroeks C.M., Niemarkt H.J., Kester A.D., Vernooij J.H., Suykerbuyk J., Teunissen J., Heynens J., Hendriks H.J., Jobsis Q., Dompeling E. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate // *Eur. Respir. J.* 2006. V. 28. P. 1036-1041.
362. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1979. V. 76 P. 4350-4354.
363. Mishra M., Tiwari S., Gomes A.V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques // *Expert Rev. Proteomics.* 2017. V. 14. P. 1037-1053.
364. Kurien B.T., Scofield R.H. Western blotting of high and low molecular weight proteins using heat // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1312. P. 247-255.
365. Mishra M., Tiwari S., Gunaseelan A., Li D., Hammock B.D., Gomes A.V. Improving the sensitivity of traditional Western blotting via Streptavidin containing Poly-horseradish peroxidase (PolyHRP) // *Electrophoresis* 2019. V. 40. P. 1731-1739.
366. Treindl F., Ruprecht B., Beiter Y., Schultz S., Döttinger A., Staebler A., Joos T.O., Kling S., Poetz O., Fehm T., Neubauer H., Kuster B., Templin M.F. A bead-based western for high-throughput cellular signal transduction analyses // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12852.
367. He M., Herr A.E. Microfluidic Polyacrylamide Gel Electrophoresis with in Situ Immunoblotting for Native Protein Analysis // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 8177-8184.
368. He M., Herr A.E. Automated microfluidic protein immunoblotting // *Nat. Protoc.* 2010. V. 5. P. 1844-1856.
369. Castro E.R., Manz A. Present state of microchip electrophoresis: state of the art and routine applications // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1382. P. 66-85.
370. Pagaduan J.V., Sahore V., Woolley A.T. Applications of microfluidics and microchip electrophoresis for potential clinical biomarker analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 6911-6922.
371. Anderson G.J.M., Cipolla C., Kennedy R.T. Western blotting using capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 1350-1355.
372. Jin S., Furtaw M.D., Chen H., Lamb D.T., Ferguson S.A., Arvin N.E., Dawod M., Kennedy R. T. Multiplexed Western Blotting Using Microchip Electrophoresis // *Anal. Chem.* 2016.V. 88. P. 6703-6710.
373. Harris V. M. Protein detection by Simple Western analysis // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1312. P. 465-468.

374. Chen J. Q., Heldman M R., Herrmann M.A., Kedei N., Woo W., Blumberg P.M., Goldsmith P.K. Absolute quantitation of endogenous proteins with precision and accuracy using a capillary Western system // *Anal. Biochem.* 2013. V. 442. P. 97-103.
375. Padhan N., Yan J., Boge A., Scrivener E., Birgisson H., Zieba A., Gullberg M., Kamali-Moghaddam M., Claesson-Welsh L., Landegren U. Highly sensitive and specific protein detection via combined capillary isoelectric focusing and proximity ligation // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 1490.
376. Hughes A.J., Spelke D.P., Xu Z., Kang C.C., Schaffer D.V., Herr A.E. Single-cell western blotting // *Nat. Methods* 2014. V. 11. P. 749-755.
377. Abdel-Sayed P., Yamauchi K.A., Gerver R.E., Herr A.E. Fabrication of an Open Microfluidic Device for Immunoblotting // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 9643-9648.
378. Zhang Y., Naguro I, Herr A.E. In Situ Single-Cell Western Blot on Adherent Cell Culture // *381 Angew. Chem. Int.* 2019. V. 58. P. 13929-13934.
379. Mruk D.D., Cheng C.Y. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits // *Spermatogenesis* 2011. V. 1. P. 121-122.
380. Anusiem C.A., Okonkwo P.O. The Impact of Treatment on the Serum Concentration of Interleukin-1 Beta in Pulmonary Tuberculosis // *Am. J. Ther.* 2017. V. 24: e329.
381. Thillai M., Eberhardt C., Lewin A.M., Potiphar. L., et al. Sarcoidosis and Tuberculosis Cytokine Profiles: Indistinguishable in Bronchoalveolar Lavage but Different in Blood // *PloS One* 2012. V. 7: e38083.
382. Van Oss C.J., Giese R.F., Bronson M., Docoslis A., Edwards P., Ruyechan W.T. Macroscopic-scale surface properties of streptavidin and their influence on aspecific interactions between streptavidin and dissolved biopolymers // *Colloids Surf.* 2003. V. 30. P. 25-36.
383. Pugliese G., Trefz P., Brock B., Schubert J.K., Miekisch W. Extending PTR based breath analysis to real-time monitoring of reactive volatile organic compounds // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 7359-7367.
384. Barton R.J. Anomalous Behaviour of Bovine Serum Albumin in Electrophoresis on Non-Denaturing Polyacrylamide Gel // *Biochem. J.* 1972. V. 129. P. 983-985.
385. Morozov V.N., Evanskey M., Tan Y.K., Shaffer D., Bailey C., Morozova T.Y. Ultrafiltration membrane for electrophoretic capturing of pathogens for AFN imaging // *Langmuir* 2006. V. 22. P. 1742-1748.
386. Aulin C., Ahola S., Josefsson P., Nishino T., Hirose Y., Osterberg M., Wågberg L. Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures-their surfaceproperties and interaction with water // *Langmuir* 2009. V. 25. P. 7675-7685.
387. Jachimaska B., Pajor A. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces // *Bioelectrochemistry* 2012. V. 87. P. 138-146.
388. Ware B.R., Flygare W.H. The simultaneous measurement of the electrophoretic mobility and diffusion coefficient in bovine serum albumin solutions by light scattering // *Chem. Phys. Lett.* 1971. V. 12. P. 81-85.

389. Gong H., Craddock M., Cheung L., Olive D.M. Development of a near-infrared fluorescence ИФА method using tyramide signal amplification // *Anal. Biochem.* 2012. V. 426. P. 27-33.
390. Hinterdorfer P., Gruber H.J., Kienberger F., Kada G., Riener C., Borken C., Schindler H. Surface attachment of ligands and receptors for molecular recognition force microscopy // *Colloids Surf. B, Biointerfaces* 2002. V. 23. P. 115-123.
391. Brough B., Northrop B.H., Schmidt J.J., Tseng H.R., Houk K.N., Stoddart J.F., Ho C.M. Evaluation of synthetic linear motor-molecule actuation energetics // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 8583-8588.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus

Статьи в журналах 1-го квартиля

- c1. **Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Improving immunoassay performance with cleavable blocking of microarrays // *Analytical Chemistry* 2021. V. 93(2). P. 1126-1134 (IF 8.008).
- c2. **Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Vinarov A.Z., Zamyatnin A.A. Jr., Shlyapnikova E.A. Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? // *Frontiers in Molecular Biosciences* 2021. V. 7. 620687 (IF 5.246).
- c3. **Shlyapnikov Y.M.**, Kanev I.L., Shlyapnikova E.A. Rapid ultrasensitive gel-free immunoblotting with magnetic labels // *Analytical Chemistry* 2020. V. 92(5). P. 4146-4153 (IF 6.986)
- c4. **Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Rapid amplification-free microarray-based ultrasensitive detection of DNA // *Analytical Chemistry* 2019. V. 91(17). P. 11209-11214 (IF 6.35).
- c5. **Shlyapnikov Y.M.**, Morozov V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels // *Analytica Chimica Acta* 2017. V. 966. P. 47-53 (IF 4.95).
- c6. **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Morozov V.N. Reversible and Irreversible Mechanical Damaging of Large Double-Stranded DNA upon Electrospraying // *Analytical Chemistry* 2016. V. 88. P. 7295-7301 (IF 6.643).
- c7. Mikheev A.Y., **Shlyapnikov Y.M.**, Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V.N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6 // *European Polymer Journal* 2016. V. 75. P. 317–328 (IF 3.743).
- c8. **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Morozov V.N. Carboxymethylcellulose film as a substrate for microarray fabrication // *Analytical Chemistry* 2014. V. 86(4). P. 2082-2089 (IF 6.083).

- c.9. Kanev I.L., Mikheev A.Y., **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Morozova T.Y., Morozov V.N. Are reactive oxygen species generated in electrospray in low currents? // Analytical Chemistry 2014. V. 86(3). P. 1511-1517 (IF 6.083).
- c.10. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., **Shlyapnikov Y. M.**, Nikitin M.P., Nikitin P.I., Nwabueze A.O., van Hoek M. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances // Journal of Aerosol Science 2014. V. 69. P. 48-61 (IF 2.856).
- c.11. **Shlyapnikov Y.M.**, Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins // Analytical Chemistry 2012. V. 84(13). P. 5596-5603 (IF 6.179).
- c.12. Morozov V.N., **Shlyapnikov Y.M.**, Kidd J., Morozova T.Ya., Shlyapnikova E.A. Conic electrophoretic concentrator for charged macromolecules // Analytical Chemistry 2011. V.83 (14). P. 5548–5555 (IF 6.175).

Статьи в журналах 2-го квартала

- c.13. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А., Потолдыкова Н.В., Светочева Я.А., Винаров А.З., Зинченко Д.В., Зерний Е.Ю., Замятнин А.А. мл., Шляпникова Е.А. Неинвазивная диагностика рака почки с помощью ультрачувствительной иммунодетекции раково-сетчаточных антигенов // Биохимия 2022. Т. 87(7). С. 877-887. [**Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Potoldykova N.V., Svetocheva Y.A., Vinarov A.Z., Zinchenko D.V., Zernii E.Y., Zamiatnin A.A. Jr., Shlyapnikova E.A. Non-Invasive Diagnostics of Renal Cell Carcinoma Using Ultrasensitive Immunodetection of Cancer-Retina Antigens // Biochemistry (Moscow) 2022. V. 87(7). P. 658-666 (IF 2.824).
- c.14. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А., Винаров А.З., Потолдыкова Н.В., Владимиров В.И., Зерний Е.Ю., Замятнин А.А. мл., Шляпникова Е.А. Раково-сетчаточные антигены в моче больных раком мочевого пузыря и предстательной железы // Биохимия 2022. Т. 87(11). С. 1648-1658. [**Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Vinarov A.Z., Potoldykova N.V., Vladimirov V.I., Zernii E.Y., Zamiatnin A.A. Jr., Shlyapnikova E.A. Cancer-Retina Antigens in the Urine of Bladder and Prostate Cancer Patients // Biochemistry (Moscow) 2022. V. 87(11). P. 1268-1276 (IF 2.824).
- c.15. Morozov V.N., Nikolaev A.A., **Shlyapnikov Y.M.**, Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Bagdasaryan T.R., Burmistrova I.A., Smirnova T.G., Andrievskaya I.Y., Larionova E.E. Nikitina I.Y., Lyadova I.V. Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using microdroplets collected from exhaled air // Journal of Breath Research 2018. V. 12. 036010 (IF 2.779).
- c.16. Morozov V.N., Mikheev A.Y., **Shlyapnikov Y.M.**, Nikolaev A.A., Lyadova I.V. Non-invasive lung disease diagnostics from exhaled microdroplets of lung fluid: perspectives and technical challenges // Journal of Breath Research 2017. V. 12. 017103 (IF 2.779).

Статья в журнале 3-го квартала

с.18. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А., Шляпникова Е.А. Быстрый метод иммуноблоттинга для определения фемтограммовых количеств белка // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2020. Т. 169 (6). С. 788-792. [**Shlyapnikov Y.M.**, Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Rapid Detection of Femtogram Amounts of Protein by Gel-Free Immunoblot // Bulletin of Experimental of Biology and Medicine 2020. V. 169(6). P. 840-843. (IF 0.775).

Патенты:

1. **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А. Замятнин А.А., Зерний Е.Ю., Потолдыкова Н.В., Светочева Я.А., Винаров А.З., Шляпникова Е.А. Способ диагностики почечно-клеточной карциномы по наличию зрительных белков аррестина и рековерина в моче. Патент РФ № 2805811 от 24.10.2023.
2. Шляпникова Е.А., Королёв Д.О., Зерний Е.Ю., Савватеева Л.В., Замятнин А.А., Винаров А.З., Филиппов П.П., Балдин А.В., **Шляпников Ю.М.**, Малахова Е.А. Способ ранней диагностики почечно-клеточной карциномы по наличию белка зрительного аррестина в сыворотке крови. Патент РФ № 2 741245 от 21.01.2021.
3. Морозов В.Н., **Шляпников Ю.М.** Способ детекции аналита из раствора на частицах и устройство для его реализации. Патент РФ № 2528885 от 20.09.2014.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность ныне покойному первому руководителю лаборатории наноструктур и нанотехнологий ИТЭБ РАН д.ф.-м.н. В.Н. Морозову, внесшему неоценимый вклад в исследование. Автор также благодарит коллектив лаборатории и всех коллег за техническую поддержку и плодотворное сотрудничество.