

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



Шляпников Юрий Михайлович

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

1.5.6. - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора химических наук

Москва – 2024

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 гибридационного 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 иммуоблот, 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 микрокаплях 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 твердой 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 газовой фазой нейтрализацией, имеют калиброванные поры и пригодны для сбора образцов выдыхаемого воздуха и последующего их анализа с целью диагностики инфекционных заболеваний.
- Разработан принципиально новый метод гибридного 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 нанофильтров 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 биомакромолекул 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 нанофильтрах, 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 гель-фильтрацией. 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.
- Ультрачувствительный 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. Нанофильтры из нейлона, изготовленные методом электрораспыления с газофазной

нейтрализацией, обладают высокой фильтрующей способностью за счёт образования калиброванных пор.

- Новый способ мультиплексного ультрачувствительного гибридационного 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.

- Новое 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 [1-6, 8, 17] составляет не менее 4/5. В работах по разработке концентрирующей ячейки [12] и тест-систем [11,13-15] 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. Замятнина (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 2, 13, 14]. Образцы выдыхаемого воздуха собраны сотрудниками ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» [15]. 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) [11].

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Ультрасенситивный иммуноанализ с электрофоретическим сбором аналитов на микрочипе для определения белковых биомаркеров в биологических образцах сложного состава

В первой главе работы описаны подходы для создания новых тест-систем для быстрой и ультрасенситивной иммунодетекции бактериальных токсинов и неинвазивной диагностики лёгочной формы туберкулёза.

1.1. Мультиплексная тест-система для определения холерного токсина (СТ), стафилококковых токсинов А (SEA) и В (SEB), термолabileного токсина *Escherichia coli* (LT) и токсина токсического шока (TSST)

В данной части работы «активный» метод анализа, предложенный В.Н. Морозовым, был усовершенствован и применён для одновременного мультиплексного обнаружения пяти бактериальных токсинов: СТ, LT, SEA, SEB и TSST. Микрочипы изготавливали методом электрораспыления (ЭР) белков на мембрану из регенерированной целлюлозы, обработанную плазмой. Данная технология позволяет за одну процедуру получить до 40000 мультиплексных микрочипов с варьируемым размером рабочих зон. В результате проведенных исследований предложена методология анализа, включающая три этапа: электрофоретический сбор токсинов на микрочипе с первичными антителами, связывание антигенов вторичными биотинилированными антителами и детекцию биотиновых меток путём сканирования поверхности микрочипа 1 мкм магнитными частицами (МЧ), покрытыми стрептавидином (SA), в сдвиговом потоке и магнитном поле. Конструкция проточной ячейки для иммуноанализа приведена на рис. 1.

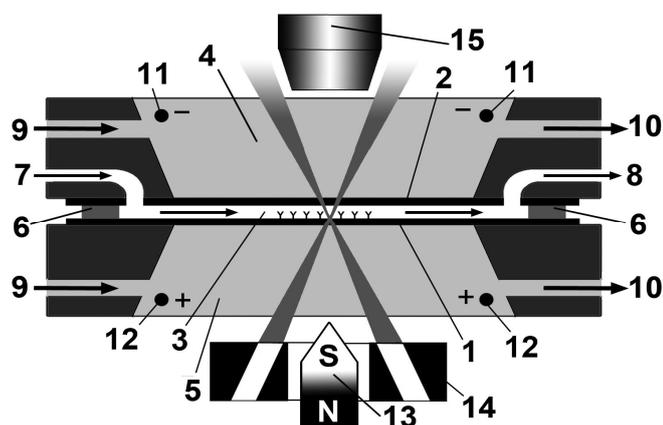


Рис. 1. Поперечное сечение проточной ячейки: 1) микрочип, 2) верхняя мембрана, 3) проточная ячейка, 4) камера верхнего электрода, 5) нижняя электродная камера, 6) прокладка кольцевого уплотнения, 7) подача анализита и суспензии МЧ, 8) выход для анализита и суспензии МЧ, 9, 10) вход и выход буфера для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

Связывание МЧ в зонах регистрировали с помощью микроскопа с темнопольным осветителем. Схема анализа представлена на рис. 2.

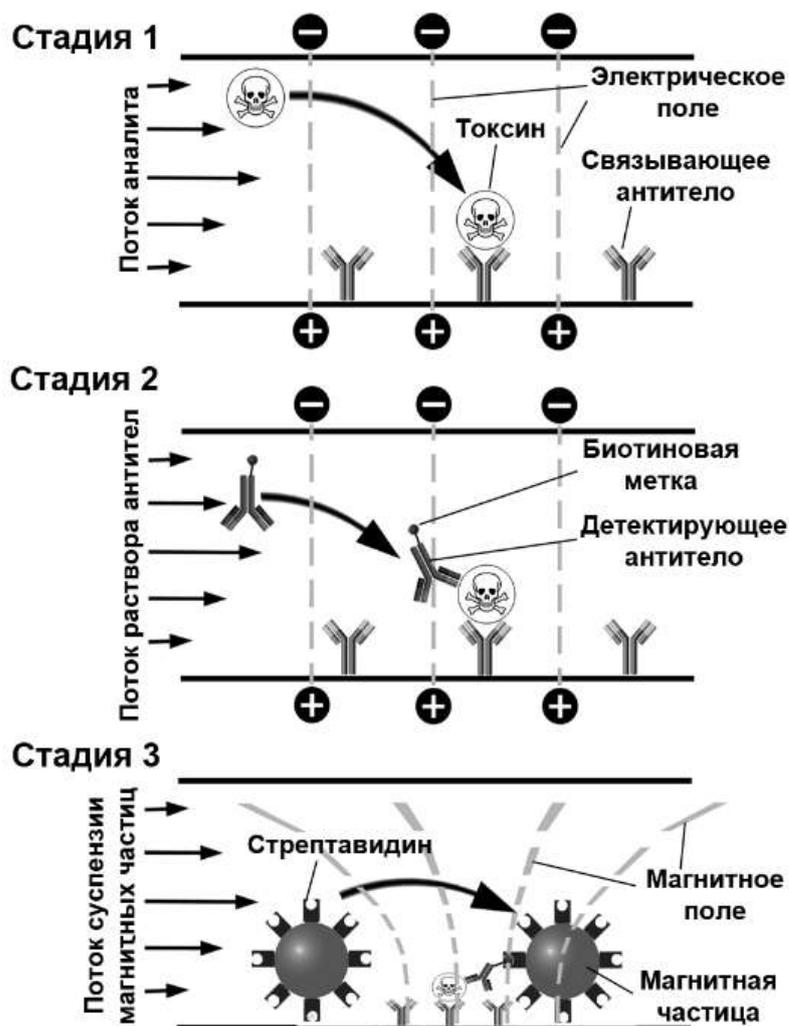


Рис. 2. Схема анализа. 1 - электрофоретическое улавливание токсинов из потока на микрочипе; 2 - активное электрофоретическое мечение связавшегося анализита с помощью биотинилированных вторичных антител; 3 - визуализация биотиновых меток SA-МЧ в сдвиговом потоке в магнитном поле.

Образец объемом 100-300 мкл пропускали через проточную ячейку с помощью шприцевого насоса в течение 3 мин при включённом напряжении (стадия 1). Затем смесь из пяти биотинилированных антител прокачивали в течение 2 мин, также при включённом напряжении (стадия 2). После выключения напряжения под ячейку помещали магнит и пропускали суспензию SA-МЧ в течение 2 мин (стадия 3). В общей сложности вся процедура занимала около 7 мин. Количество связанных магнитных меток в зонах определяли с помощью программного обеспечения собственной разработки, подсчитывающего яркие пятна заданного размера на тёмном фоне. Для оценки предела обнаружения для каждого токсина были построены градуировочные графики зависимости значения сигнала от концентрации анализита и рассчитаны стандартные отклонения по данным 20 микрочипов. Сигнал считался положительным, если отношение сигнал/шум, вычисляемое как (средний сигнал - отрицательный сигнал)/стандартное отклонение (СО) отрицательного контроля превышало 2,5, что соответствует уровню достоверности 0,99. Антитела, которые не проявляли перекрёстной реактивности при концентрациях токсинов до 1 мкг/мл, были использованы для проведения мультиплексного анализа пяти токсинов. Полученные значения предела обнаружения (PrO) совпали со значениями для одиночных токсинов и составили: 0,1 пг/мл для SEA, SEB, TSST и CT и 1 пг/мл для LT. Таким образом, эффективность выявления каждого токсина не зависела от присутствия в образце других токсинов. На следующем этапе был проведен мультиплексный анализ образцов молока и экстракта мяса, в которые заранее были добавлены определенные количества токсинов. Из данных, приведённых на рис. 3, следует, что при переходе от образцов простого состава (буферный раствор и водопроводная вода) к образцам продуктов питания, содержащим большой избыток белков и других интерферирующих примесей, значения PrO падают на порядок. Однако, принимая во внимание, что содержание белка в молоке и экстракте мяса составляет не менее 1%, биотоксины могут быть обнаружены среди $\sim 10^{10}$ -кратного избытка других белковых молекул. Таким образом, на основе «активной» технологии разработана тест-система, позволяющая одновременно выявлять в образцах молочных и мясных продуктов бактериальные токсины SEA, SEB, TSST, LT и CT с чувствительностью 0,1-1 пг/мл менее чем за 10 мин. Если учесть, что типичная молекулярная масса токсина составляет ~ 80 кДа, получается, что данным методом можно обнаружить 100 зептомоль или 10^5 молекул токсина в 100 мкл образца (~ 1 фМ).

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 анализитов ограничено только количеством активных зон на микрочипе и может составлять до нескольких десятков. Кроме того, разработана тест-система для решения социально значимой задачи: обнаружения биомаркеров бактериальных патогенов в воде и продуктах питания.

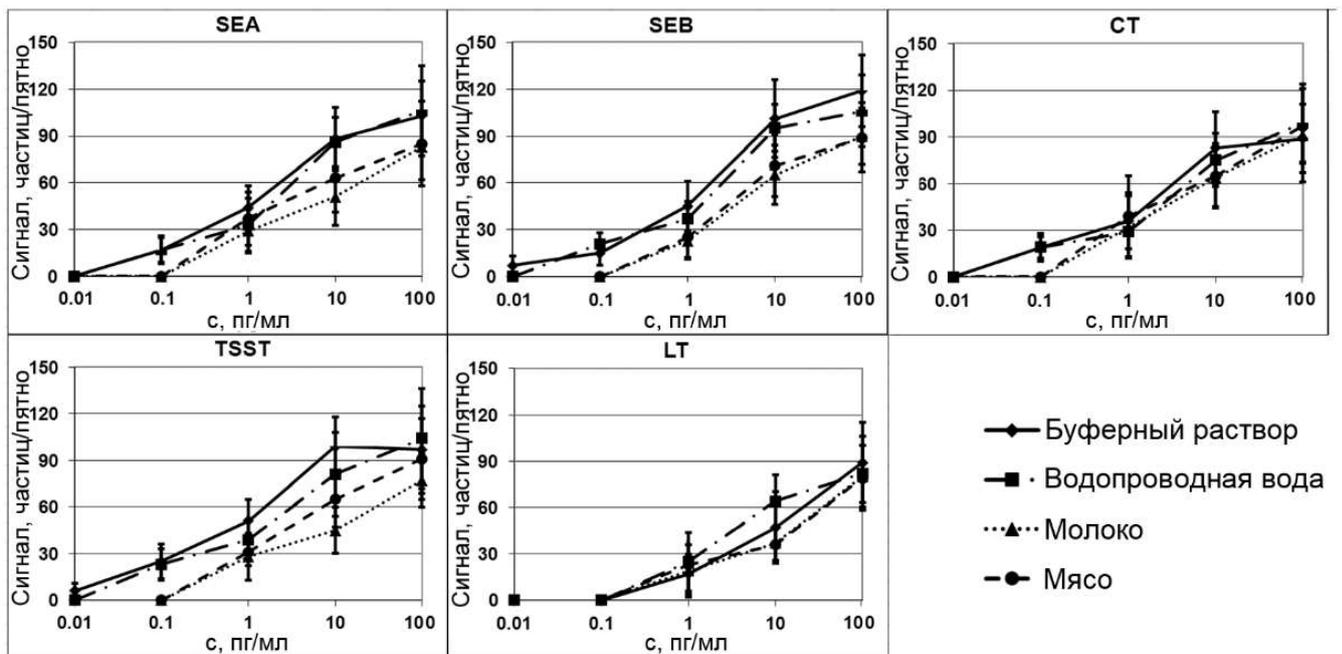


Рис. 3. Зависимость сигнала от концентрации токсинов в разных средах. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$.

1.2. Количественный ультрачувствительный иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками

Как следует из рис. 3, низкий динамический диапазон в сочетании с высокими вариациями сигнала в иммуноанализе с магнитными метками позволяют измерять концентрацию аналита с очень низкой точностью $\pm 0,5 - 1$ десятичный порядок. Поэтому в работе были разработаны нововведения, которые существенно повысили точность метода и обеспечили количественные измерения концентраций аналита до 10 фг/мл. Улучшения были достигнуты путём (i) 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 было продемонстрировано при измерении концентрации моноклональных антител, специфичных к антигенам, секретлируемым *M. tuberculosis*. Дизайн микрочипа, представленный на рис. 4А, позволяет одновременно выявлять общий (m-IgG) и специфичный к секретлируемым *M. tuberculosis* антигенам ESAT-6 и Pst1 IgG мыши. Зависимость сигнала от концентрации антигенов описывается сигмоидной кривой с динамическим диапазоном ~ 3 порядка (рис. 4Б). Рассчитанное по градуировочным графикам значение ПрО для всех исследованных аналитов составило ~ 10 фг/мл или ~ 100 аМ (рис. 4Б).

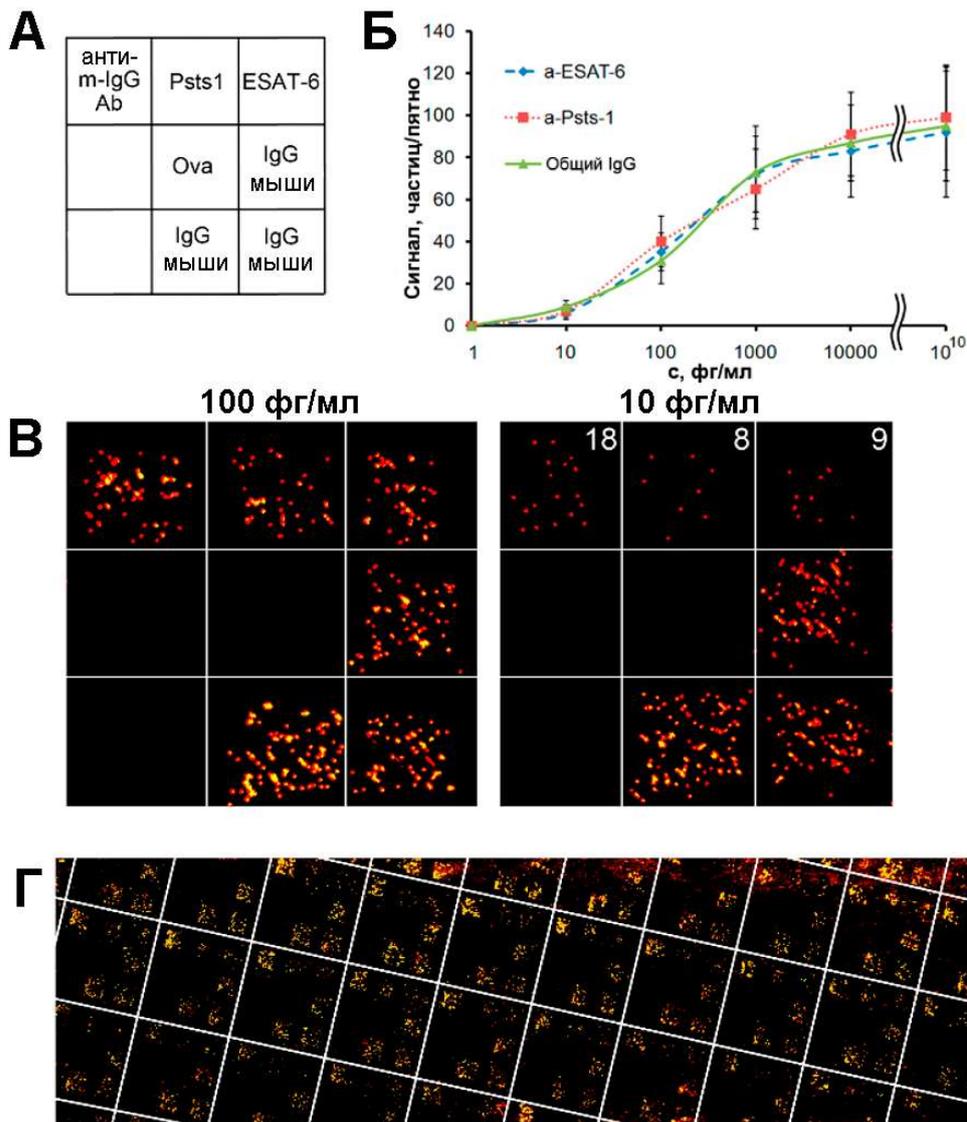


Рис. 4. (А) Дизайн микроочипа, используемого в модельном анализе. (Б) Градуировочные графики для определения ПрО ТБ-специфических антител мыши (точки с ошибками, соответствующими $2,5 \times \text{СО}$). Отрицательный контроль – овалбумин (Ova), положительный контроль - IgG мыши. (В) Репрезентативные изображения сигналов, полученные при анализе образцов с различными концентрациями ТБ-специфических антител. Размер каждой зоны - $100 \times 100 \text{ мкм}^2$; объём образца - 100 мкл. (Г) Полное изображение микроочипа, полученное при анализе 1 мкл сыворотки крови человека, разбавленного в 100 раз. Белые линии разделяют рабочие зоны.

На рис. 4Г видно, что интенсивность сигнала на различных повторах микроочипа существенно варьирует, что приводит к снижению точности измерения среднего значения. Чтобы повысить точность измерения концентраций, была введена процедура внутренней нормировки сигнала. Для каждого микроочипа количество частиц в трёх зонах положительного контроля усреднялись, 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. 5А, относительные ошибки измерения сигнала, вычисленные по всем видимым микроочипам на рис. 4Г 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 микроочипов и др.

Однако, хотя введение внутренней нормировки уменьшило вариации сигнала, точность количественного измерения сигнала осталась невысокой вследствие слабой зависимости сигнала от концентрации. 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. 5Б) и быстро уменьшается при повышении концентрации аналита. Это обстоятельство имеет чрезвычайно важное значение, так как вблизи ПрО сигнал сильно зависит от концентрации, что делает возможным ее количественное измерение. Чтобы найти область линейного участка, который растянут по концентрации аналита примерно на порядок, следует проанализировать серию 10-кратных разведений одного и того же образца, начиная с самого высокого. Для количественного измерения используется результат анализа самого высокого разведения, при котором появляется 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.

Применимость такого подхода для количественных измерений аналитов на микрочипах была протестирована в иммуноанализе на ТБ-специфические антитела в крови человека (рис. 7). 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. 4Б).

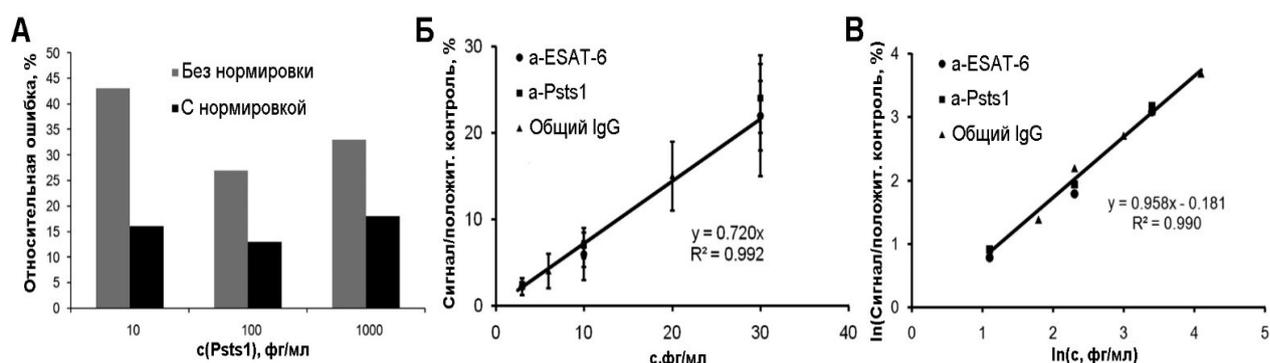


Рис. 5. (А) Применение внутренней нормировки сигнала в иммуноанализе специфических антител против ESAT-6, Pst1 и IgG. Относительная ошибка определения Pst1 (сигнал/среднее значение сигнала) при различных концентрациях аналита. (Б) Зависимость нормированного сигнала от концентрации аналита вблизи ПрО. Пределы погрешности соответствуют $2,5 \times CO$. (В) Та же зависимость, представленная в двойных логарифмических координатах и демонстрирующая наклон, равный единице.

Для определения специфичности иммуноанализа использовались высокие концентрации антител – до 100 мкг/мл. На рис. 6А показаны репрезентативные примеры изображений микрочипов, полученных в одном из экспериментов. На рис. 6 (Б, В) приведены градуировочные графики для определения ПрО антител против ESAT-6 и Pst1. Никакой перекрёстной реактивности между антигенами ESAT-6 и Pst1 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 Pst1 в сильно гетерогенном пуле иммуноглобулинов. При более низкой общей концентрации IgG, 10 мкг/мл, которая используется в анализе, сигнал отсутствовал. Как следует из рис. 6 (Б, 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 ($10 \text{ фг/мл} / (10 \text{ мкг/мл}) = 10^{-9}$).

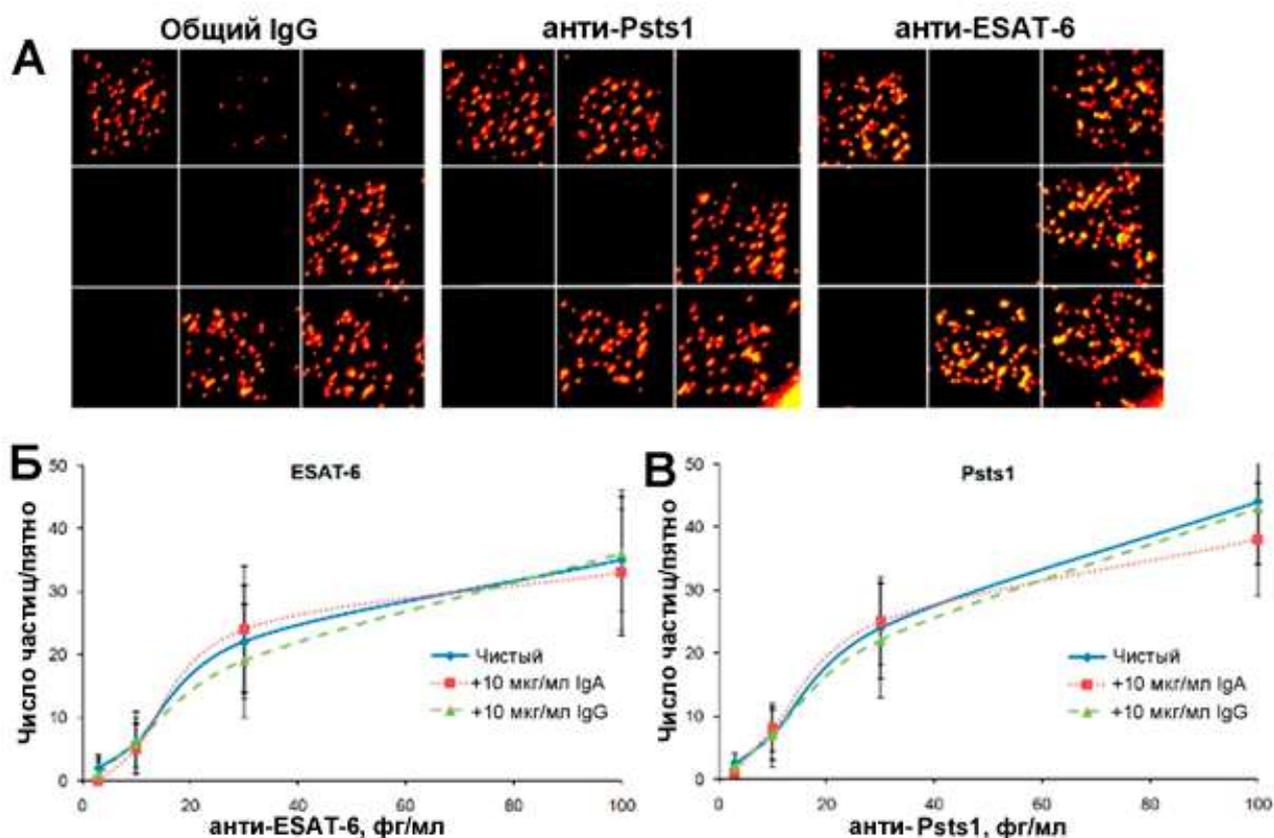


Рис. 6. Иллюстрация специфичности иммуноанализа ТБ-специфических иммуноглобулинов. (А) В каждом анализе использовали по 100 мкл антител с концентрацией 100 мкг/мл. (Б, В) Зависимость сигналов, выраженных как количество МЧ в одной рабочей зоне, от концентрации антител к ESAT-6 (Б) и Pst1 (В) в присутствии и в отсутствие иммуноглобулинов IgA и IgG. Пределы погрешности соответствуют $2,5 \times \text{CO}$.

Анализ серии 10-кратных разведений одного и того же образца крови позволил определить долю ТБ-специфических антител относительно общего иммуноглобулина. Рабочие зоны с антигенами Pst1 и ESAT-6 стали видимыми при разведении крови 1:100 (рис. 7). Вычисленные на основании градуировочного графика концентрации анти-Pst1-IgG и анти-ESAT-6-IgG составили $3,6 \pm 1,1 \text{ пг/мл}$ и $3,0 \pm 1,0 \text{ пг/мл}$ соответственно. При этом концентрация общего IgG в образце была определена на уровне $1,3 \pm 0,3 \text{ мг/мл}$. Следовательно, доля Pst1- и ESAT-6-специфических IgG составила $(2 - 3) \times 10^{-9}$. Таким образом, наша методика количественного анализа позволяет измерять крайне низкие титры антиген-специфических иммуноглобулинов в сыворотке.

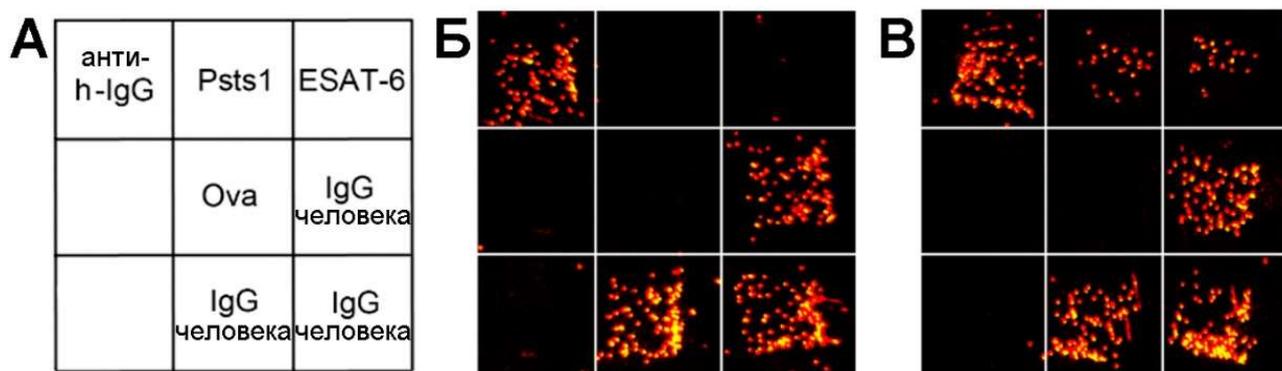


Рис. 7. Иллюстрации сигналов, полученных при анализе образцов крови человека. (А) Дизайн микрочипа. (Б) Анализ контрольного образца, не содержащего ТБ-специфических антител (1 мл сыворотки крови разбавлен в 100 раз). (В) Анализ образца крови участника контрольной группы, положительного на ТБ-специфические антитела, проведённый в тех же условиях.

1.3. Использование нейлоновых наночистот для сбора микрокапель лёгочной жидкости из выдыхаемого воздуха

Одним из перспективных объектов для применения ультрочувствительных методов анализа являются аэрозоли различного происхождения. В частности, для неинвазивной диагностики лёгочных заболеваний большой практический интерес может представлять анализ наночистот 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 газовой фазой нейтрализацией волокон были получены наночистоты из нейлоновых волокон диаметром 30-60 нм. Для эффективного сбора аэрозоля из воздуха решающую роль играет сочетание фильтрующих свойств и аэродинамического сопротивления материала, определяемое распределением пор в фильтре по размеру: чем более узкое распределение, тем лучше фильтрующие свойства. В данной работе была смоделирована и проанализирована структура пор в получаемых наночистотах.

Моделируемые наночистоты конструировали из линейных волокон, распределённых по площади квадрата случайным образом (рис. 8А). Экспериментальные изображения, полученные с помощью сканирующей электронной (СЭМ) и атомно-силовой (АСМ) микроскопии, преобразовывали в двоичную форму, приписывая каждый пиксель либо к волокну, либо к поре. Распределение размеров пор как на модельных, так и на экспериментальных изображениях рассчитывали с использованием программного обеспечения собственной разработки. Для модельных наночистот со случайным расположением волокон логарифм доли пор, пропускаемых для частиц диаметром меньше d , хорошо описывается линейной функцией: $\ln [p(d)] = k_1 d$ (рис. 8Б). Расчёт распределения размеров пор для нескольких опубликованных изображений наночистот, полученных электропрядением на проводящую подложку без газовой фазы нейтрализации, показал, что модельные наночистоты и наночистоты, полученные осаждением на электроде, идентичны с точки зрения распределения размеров пор (рис. 8 В,Г). Таким образом, независимо от того, насколько плотно наночистоты упакованы в фильтре, всегда присутствует фракция больших пор. Это указывает на то, что как в модельных, так и наночистотах, полученных на металлическом электроде, нет пороговой зависимости проникновения частиц от размера.

Однако существенное отличие от случайного распределения обнаружено при анализе изображений наночистот, полученных ЭП с газовой фазой нейтрализацией. Полулогарифмические графики распределения фракций пор как функции их размеров заметно отклоняются от линейности, а само распределение может быть аппроксимировано эмпирической функцией: $\ln [p(d)] = -k_1 d - k_2 d^2$ (рис. 8Д,Е). Нелинейность, описываемая параметром k_2 , приводит к уменьшению доли более крупных пор в $\exp(-k_2 d^2)$ раз. Так, со значением $k_2 \sim 3 \times 10^{-6} \text{ нм}^{-2}$, характерным для распределения на рис. 8Е, число пор, пропускаемых 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 наночистотных частиц в наночистотах, полученных ЭП с газовой фазой нейтрализацией. Преимущественное осаждение заряженных наночистотных волокон в свободном пространстве между имеющимися волокнами может быть результатом действия сильного локального электрического поля в самой поре. В противоположность наночистотам, получаемым на металлической подложке, в наночистотах, изготовленных с нейтрализацией облаком противоионов, существует механизм залечивания больших пор, заключающийся в электростатическом притяжении заряженных волокон и противоионов, которые создают электростатический потенциал в порах большого размера. В результате получаются высококачественные наночистоты с калиброванными порами, которые сочетают низкое проникновение аэрозольных частиц с минимальным сопротивлением воздушному потоку и минимальной плотностью

полимерного материала. Такие наночастицы могут быть использованы в различных биотехнологических приложениях. В частности, наночастицы, 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. Эффективность использования нейлоновых наночастиц в биомедицинских целях показана в следующем разделе.

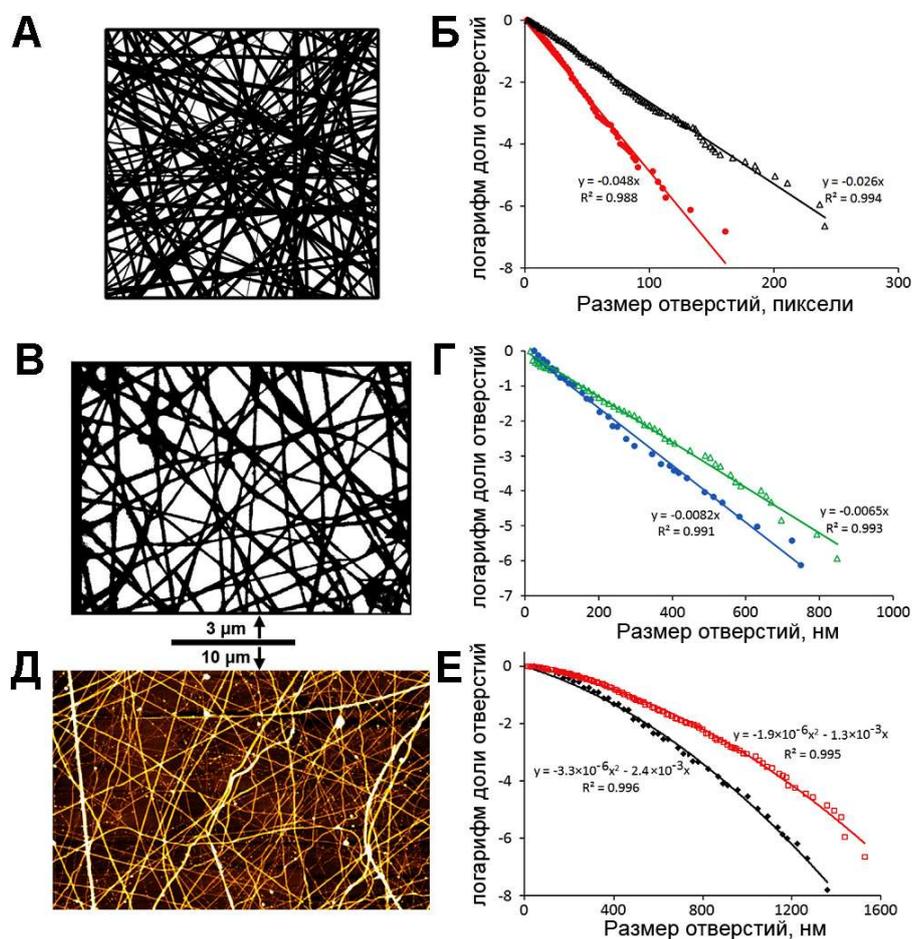


Рис. 8. Распределение размеров пор в модельных и реальных наноматах. (А) Изображение модельного наномата со случайным распределением волокон. (Б) Распределение размеров пор в смоделированных фильтрах с плотностью волокон (суммарная длина на единицу площади) 0,025 пикселя⁻¹ (черный цвет) и 0,05 пикселя⁻¹(красный цвет). (В) Бинаризованное изображение наномата, полученного электропрядением без газовой нейтрализации [Bergshoef M.M., Vancso G.J. Adv. Mater. 1999. V. 11. P. 1362–1365]. (Г) Распределение размеров пор, рассчитанное для СЭМ-изображений описанных в литературе наноматов [Stachewicz U., Modaresifar F., Bailey R.J., Peijs T., Barber A.H. ACS Appl. Mater. Interfaces 2012. V. 4. P. 2577–2582; Bergshoef M.M., Vancso G.J. Adv. Mater. 1999. V. 11. P. 1362–1365]. (Д) АСМ-изображение наномата, полученного электропрядением с газовой нейтрализацией. (Е) Распределение пор в наномате на панели Д, рассчитанное на основе изображений, полученных с помощью АСМ (красная кривая) и СЭМ (черная кривая).

1.4. Применение ультрачувствительного иммуноанализа для бесконтактной диагностики туберкулёза лёгких по выдыхаемому воздуху

Детекция биомаркеров в образцах альвеолярной жидкости предоставляет потенциальную возможность для диагностики лёгочной формы туберкулёза (ТБ) и других инфекционных заболеваний лёгких. Одним из неинвазивных способов получения образцов является сбор

нанокапель лёгочной жидкости в выдыхаемом воздухе на фильтрах. В данной работе для неинвазивной диагностики туберкулёза лёгких впервые применен сбор нанокапель лёгочной жидкости из выдыхаемого воздуха на нанофильтрах собственного изготовления. Образцы для иммуноанализа получали, смывая биологический материал с нейлоновых нанофильтров буфером при интенсивном перемешивании. В исследовании участвовали 42 пациента с диагностированным туберкулёзом лёгких и 13 участников контрольной группы, не имеющих выраженных симптомов болезни. В работе были использованы фильтры, задерживающие не менее 95% частиц размером 0,3 мкм. Время сбора образца составляло 10 мин. Микрочип для анализа IgA (рис. 10А) включал зону иммобилизованных ТБ-специфических антигенов ESAT-6 и PstS1, зону поликлональных антител, специфичных к IgA человека (h-IgA) или h-IgG, зоны положительного и отрицательного контроля. Микрочип для анализа на антигены туберкулёза содержал зону моноклональных антител против PstS1 и анти-ESAT-6 и зоны антигенов PstS1 и ESAT-6 в качестве положительных контролей. После электрофоретического сбора аналитов в активных зонах микрочипа через ячейку прокачивали суспензию МЧ, покрытых поликлональными антителами против h-IgA и h-IgG (для анализа иммуноглобулинов) или антителами против PstS1 и ESAT-6 (для анализа ТБ-специфических антигенов). Картины связавшихся МЧ на 12–15 зонах, видимых в канале, регистрировали камерой, подключённой к микроскопу с темнопольным осветителем.

Для оценки количеств антиген-специфических антител в образце использовали процедуру титрования, описанную выше. Анализ начинали с самого высокого разбавления образца, которое было предварительно определено в специальных экспериментах. Системы иммунодетекции для каждого аналита (ESAT-6, PstS1, общий IgA и IgG, специфичные для ESAT-6 и PstS1) тестировали на однокомпонентных микрочипах. Тест-системы для антиген-специфических иммуноглобулинов против ТБ оценивали с использованием моноклональных антител к ESAT-6 и PstS1 и МЧ, покрытых поликлональными антителами к m-IgG. Определённое значение ПрО моноклональных антител, специфичных к ESAT-6 и PstS1, ~ 1 фг/мл, соответствует $\sim 10^4$ молекул иммуноглобулина в образце объёмом 500 мкл.

Поскольку антиген-специфический h-IgG не был обнаружен ни в первой десятке образцов больных ТБ, ни в пяти образцах участников контрольной группы, он был исключён из дальнейшего рассмотрения. Для иммуноанализа были изготовлены два типа многокомпонентных микрочипов: для одновременного обнаружения общего и специфического IgA (рис. 9А) и для обнаружения антигенов ESAT-6 и PstS1. Примеры изображений микрочипов показаны на рис. 9 Б-Г. Как видно, антитела к секретируемым микобактериальным антигенам обнаруживались, даже когда их количество в образце составляло 4×10^4 молекул. Как и в случае с клетками микобактерий ТБ и ДНК (работа выполнена в ЦНИИТ), иммуноанализ не выявил в образцах антигенов ESAT-6 или PstS1. Принимая во внимание установленный ПрО, можно заключить, что уровни ESAT-6 и PstS1 в собранных образцах были ниже 10 фг. При оценке общего содержания IgA образцы с уровнем антител < 40 фг исключались из рассмотрения по причине неудовлетворительного сбора. Из 32 оставшихся образцов антитела против ESAT-6 были обнаружены в 14 (44%; порог для положительного результата установлен на уровне > 1 фг), а антитела против PstS1 - в 22 образцах (69%). Антитела к PstS1 были также обнаружены в 13 из 14 образцов, содержащих анти-ESAT-6.

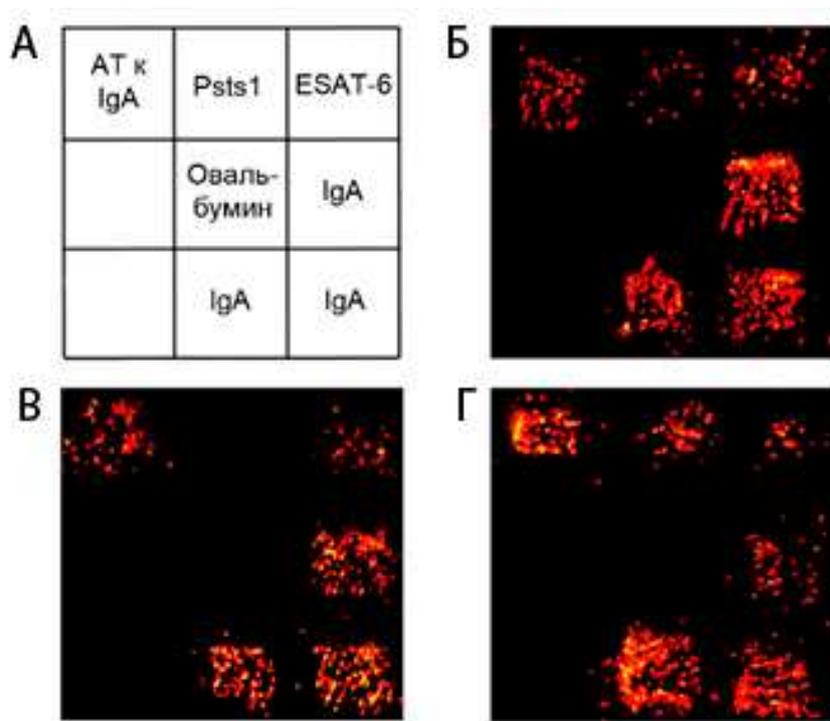


Рис. 9. Примеры анализа выдыхаемых биомаркеров в образцах пациентов с туберкулёзом лёгких. (А) Дизайн микрочипа. (Б)-(Г) Результаты иммуноанализа. Содержание IgA в образцах больных: (Б) 0,03 - 0,1 пг общего IgA, 3 фг анти-ESAT-6 IgA и <0,1 фг анти-PstS1 IgA; (В) 1,0 мкг общего IgA, 30 мкг анти-ESAT-6 IgA и 8 мкг анти-PstS1 IgA; (Г) 1,7 пг общего IgA, 20 фг анти-ESAT-6 IgA, 130 фг анти-PstS1 IgA.

Для контроля образцы выдыхаемого воздуха, собранные у 13 участников контрольной группы без выраженных симптомов болезни, были проанализированы на ТБ-специфические антитела. IgA был обнаружен во всех пробах, кроме одной. Из 12 образцов анти-ESAT-6 был детектирован у 3 (25%) и анти-PstS1 - у 5 пациентов (42%). Чтобы проверить воспроизводимость результатов, у шести участников были собраны повторные пробы. У двоих были обнаружены антиген-специфические антитела, несмотря на колебания в общем количестве IgA, которое варьировало от 170 фг до 940 фг. У одного человека с низким уровнем специфических антител такие антитела не были найдены и при повторном анализе. Учитывая только образцы, собранные у 32 пациентов и 12 контролей, содержащие заметные уровни общего IgA, расчёт диагностической чувствительности и специфичности даёт значения 72% и 58% соответственно. В работе была также проанализирована корреляция между тяжестью протекания болезни и количеством ESAT-6- и PstS1-специфических антител. Для корреляционного анализа были отобраны 32 образца с уровнем IgA > 40 фг. Единственная корреляция, найденная с помощью анализа Спирмена, была показана между уровнями анти-ESAT-6 IgA и степенью экскреции бактерий ($r = 0,37$, $p = 0,04$). Эти результаты можно интерпретировать как тенденцию к установлению взаимосвязи между концентрацией антител в выдыхаемом воздухе и количеством микобактерий в лёгких.

Таким образом, насколько нам известно, впервые выдыхаемый воздух больных туберкулёзом лёгких был проанализирован на наличие антител к ТБ-антигенам. Предел обнаружения общего и специфического иммуноглобулина в собранном образце достигает 1 фг, что эквивалентно 4000 молекулам IgA. Однако не во всех образцах, взятых у пациентов с лёгочной формой туберкулёза, были обнаружены ТБ-специфические антитела и IgA. Кроме чисто технических причин, может иметь значение меньшее количество выдыхаемых микрокапель больными с обструкцией дыхательных путей.

Как следует из представленных данных, использование двух биомаркеров инфекции не смогло дифференцировать больных ТБ и участников контрольной группы, имевших контакты с

инфицированными людьми. У этих испытуемых были найдены антитела, специфичные к одному или обоим антигенам, секретируемым микобактерией. Очевидно, что для повышения специфичности и чувствительности метода следует привлекать другие биомаркеры. Можно полагать, что параллельное обнаружение ТБ-специфических антител и биомаркеров воспаления, таких как провоспалительные цитокины, повысят специфичность и чувствительность анализа. Однако очевидно, что неинвазивный способ диагностики туберкулёза, как и других лёгочных инфекций, по выдыхаемому воздуху имеет большие перспективы для скрининга больших групп населения.

2. Разработка новых подходов для ультрачувствительного определения фрагментов ДНК

2.1. Изучение генерации активных форм кислорода при электрораспылении

Разрабатываемые методы мультиплексного анализа биомакромолекул основаны на использовании микрочипов, изготовленных методом ЭР. Электрогидродинамическое распыление широко используется в различных приложениях, при этом в ряде работ показано снижение активности ферментов после ЭР. Основным повреждающим фактором принято считать коронный разряд, при котором образуются активные формы кислорода (АФК). Цель данной части работы заключалась в установлении подходящих условий для ЭР и факторов, влияющих на целостность биомакромолекул. Результаты измерения количеств пероксида водорода, озона, гидроксильных радикалов, супероксид-анионов, генерируемых при ЭР водных растворов, показали, что несмотря на испускание света и другие признаки коронного разряда, процесс характеризуется удивительно низкими выходами АФК (таблица 1). Типичная концентрация пероксида водорода в 10 мл воды после ЭР воды в течение 20 мин при токе 150 нА составляла всего 0,3–0,6 мкМ при отрицательном потенциале и ~0,15 мкМ при положительном. Таким образом, выход АФК при ЭР в условиях, при которых осуществляется изготовление микрочипов, оказался крайне мал, что дает основания предполагать отсутствие окислительного повреждения биомакромолекул при производстве микрочипов методом ЭР.

Таблица 1. Расчёт выходов различных АФК. Знаки «+» и «-» перед значением тока обозначают знак потенциала на капилляре, из которого распыляли этанол на заземленный электрод.

Продукт	Детектирующий реагент	Ток, нА	Выход (моль/электрон)
H ₂ O ₂	Ampliflu Red, пероксидаза	+150	0,7; 1,0; 0,5
		-150	1,4; 2,1; 2,6; 3,2
		+250	0,6
ОН·	умарин-3-карбоновая кислота	+150	<0.001
		-150	<0.001
O ₂ ⁻	итросиний тетразолий	+150	<0.015
		-150	≤0.007
O ₃	Индигокармин	+150	<0.3
		-150	<0.3

2.2. Изучение механического повреждения молекул ДНК при электрораспылении

Электрораспыление нуклеиновых кислот используется в масс-спектрометрии, при трансфекции генов, изготовлении микрочипов. Следует отметить, что генерируемые при ЭР наноаэрозоли ДНК могут стать перспективными агентами для генной терапии с селективной доставкой лекарств. В настоящей работе ЭР является ключевой стадией изготовления ДНК-микрочипов для применения в ультрачувствительном гибридизационном анализе, в связи с чем было проведено исследование возможного повреждения молекул ДНК при ЭР. Процесс ЭР включает в себя события с высокой энергией, такие как интенсивные потоки и вихри в конусе Тейлора, высокоскоростной поток в струе жидкости и образование высокоэнергетических частиц

в коронном разряде. За повреждение ДНК могут быть ответственны как химические факторы, так и физические, такие как механический разрыв. При этом молекулы нуклеиновых кислот по сравнению с белками намного чувствительнее к механическому разрыву под действием гидродинамических сил, действующих в процессе распыления, из-за большего линейного размера.

Фрагментацию ДНК и структурные изменения изучали с помощью электрофореза в агарозном геле и АСМ. Ключевые факторы, влияющие на повреждение ДНК, были определены для линейной dsДНК фага λ длиной около 50 тыс. пар оснований (п.о.), а также для более коротких её фрагментов.

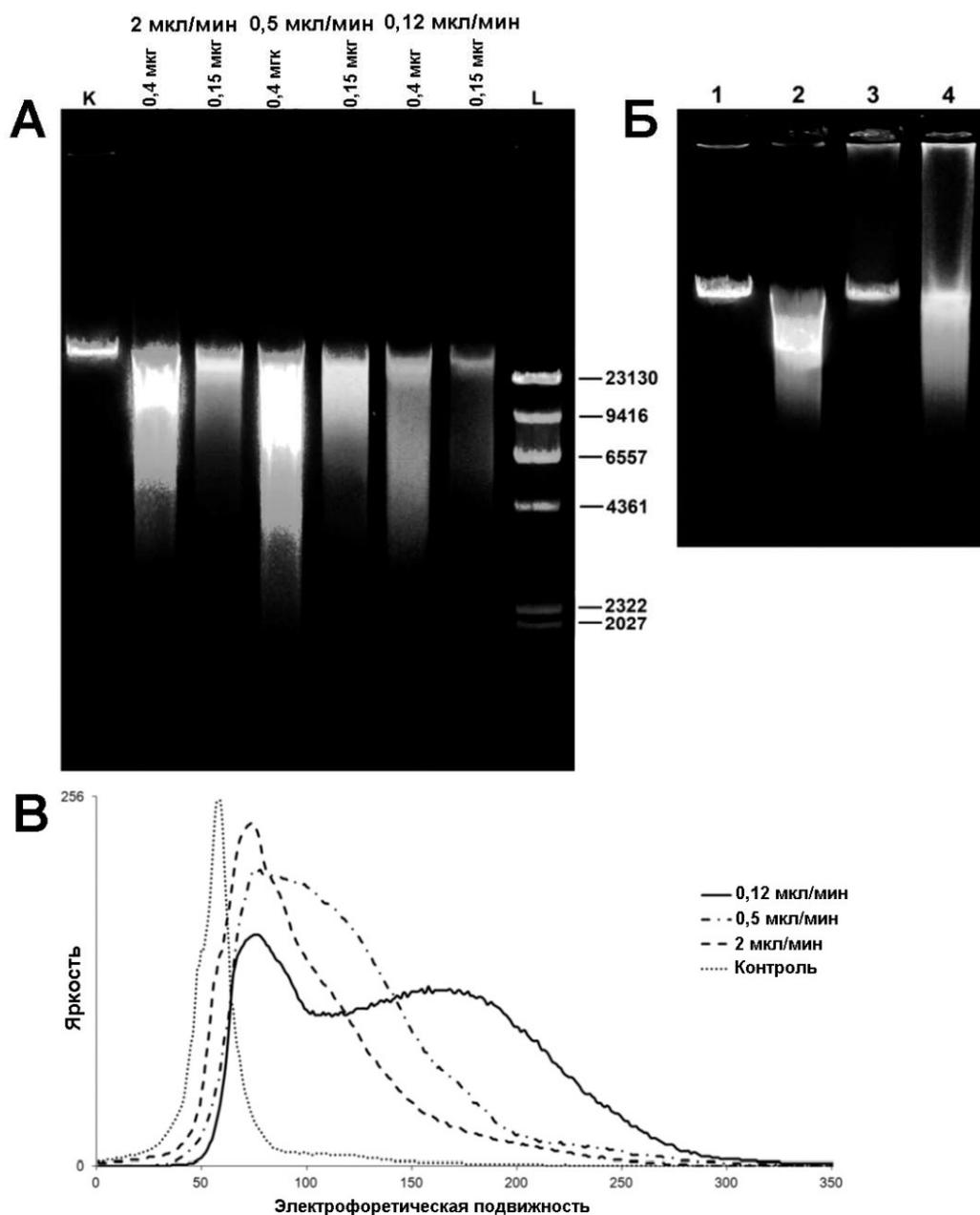


Рис. 10. Повреждение ДНК фага λ в зависимости от скорости ЭР. (А) Электрофорез образцов электрораспылённой ДНК при разных скоростях ЭР. К - нативная ДНК, L - маркеры молекулярных масс. (Б) Влияние инкубации электрораспылённой ДНК в 2 М мочеvine на положение полосы sd-ДНК. Дорожки: 1 - нативная ДНК; 2 - электрораспылённая ДНК; 3 - нативная ДНК, инкубированная в 2М мочеvine; 4 - электрораспылённая ДНК, инкубированная в

2М мочеvine. (В) Фотометрические профили электрофоретических дорожек, полученных при ЭР 0,15 мкг ДНК, при различных скоростях ЭР (панель А).

Показано, что ДНК значительно повреждается при всех испытанных условиях ЭР (рис. 10А). Об этом свидетельствует непрерывный шлейф фрагментов ДНК с более низкой молекулярной массой, что может быть объяснено случайными разрывами молекул в неспецифических местах. Другим заметным эффектом является смещение положения полосы с наименьшей подвижностью (так называемая sd-ДНК) относительно положения неповреждённой ДНК. Это смещение является обратимым (после инкубации в 2М мочеvine (рис. 10Б) подвижность этой полосы восстанавливается до подвижности исходной ДНК) и может быть объяснено неполной ренатурацией ДНК, подвергшейся частичному плавлению под действием механической силы. Фрагментацию ДНК характеризовали с помощью программного обеспечения собственной разработки. По рассчитанным профилям светимости можно выделить область sd-ДНК и непрерывный набор более мелких фрагментов (рис. 10В). Долю фрагментированной ДНК рассчитывали, сравнивая количество ДНК в шлейфе и в полосе sd-ДНК. Обоснованность расчёта подтверждали сравнением рассчитанного спектра фрагментов по светимости с аналогичным спектром, полученным из данных АСМ. Показано, что средняя длина фрагмента, в отличие от доли фрагментированной ДНК, сильно зависит от скорости ЭР. При этом, независимо от скорости, часть молекул ДНК избегает фрагментации. Обнаружено, что степень фрагментации ДНК зависит от её размера: чем меньше фрагмент, тем меньше он повреждается при ЭР. Проанализировано также влияние других физических и химических факторов: вязкость, поверхностное натяжение, ионная сила распыляемого раствора, полярность потенциала на капилляре, концентрация ДНК, добавление восстановителей, таких как дитиотреитол и аскорбиновая кислота. Ни один из этих факторов не влиял на повреждение ДНК. При этом степень деструкции была тем выше, чем длиннее фрагмент и больше время действия механической силы. Эти данные указывают на то, что ДНК фрагментируется вязкими силами в конусе Тейлора или в непосредственной близости от него. По нашей оценке, сила вязкого сопротивления, действующая при ЭР на молекулу ДНК фага λ , достигает 250 нН. Если за повреждение ДНК ответственны механические силы, конденсация линейных молекул в глобулы должна защитить их от повреждения. Для конденсации молекул ДНК был использован хлорид гексаамминкобальта (III). Анализ электрофоретических данных продуктов распыления конденсированной ДНК не выявил каких-либо заметных повреждений. В этом случае на изображениях продуктов, полученных методом АСМ, наблюдались множественные глобулы с постоянным размером и высотой (рисунки не приведены). При конденсации гидродинамический радиус клубка ДНК в водном растворе уменьшается с 600 до 40 нм, что приводит к значительному уменьшению действующих на ДНК гидродинамических сил. Поскольку конденсация полностью защитила молекулы как от фрагментации, так и от нарушения её вторичной структуры, можно заключить, что повреждение ДНК действительно вызвано механическими силами. Полученные в настоящей работе результаты в сочетании с литературными данными по численному моделированию скоростей потока в конусе Тейлора указывают, что ускоряющийся поток жидкости вблизи вершины конуса Тейлора является наиболее вероятным местом повреждения длинных линейных молекул ДНК.

Таким образом, впервые обнаружено, что линейные фрагменты ДНК длиной более 5 тыс. п.о. при ЭР подвергаются значительному механическому повреждению, которое состоит как из разрыва молекул ДНК, так и из обратимых структурных изменений. Степень фрагментации повышается с увеличением длины ДНК и уменьшением скорости потока раствора, так что ЭР 20-30-членных олигонуклеотидов, используемых для изготовления ДНК-микрочипов, не приводит к их повреждению. Полученные данные могут быть полезны также для понимания фундаментальных процессов, происходящих при ЭР, а именно, природы и масштаба механических сил, действующих на молекулярные структуры. Поскольку процесс ЭР позволяет генерировать скорости нагружения выше 10^9 пН/с, которые нельзя получить другими экспериментальными методами, он может стать уникальным инструментом для изучения молекулярной механики ДНК при чрезвычайно высоких силах и быстрых нагрузках.

2.3. Быстрый ультрачувствительный гибридационный анализ на микрочипах

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является общепризнанным «золотым стандартом» для выявления низких концентраций фрагментов ДНК. Однако имеющиеся у ПЦР ограничения по экспрессности анализа, а также ограничения, связанные с влиянием на результат интерферирующих примесей, делают актуальной разработку новых, пусть и менее чувствительных, но высокоспецифичных и быстрых методов.

Основой разрабатываемой тест-системы для ультрачувствительного экспресс-анализа фрагментов ДНК являлись микрочипы на основе мембраны из регенерированной целлюлозы с иммобилизованными на её поверхности олигонуклеотидами. Ковалентная иммобилизация олигонуклеотидов на целлюлозной мембране в литературе не описана и поэтому была исследована на первом этапе. Установлено, что наиболее подходящим способом активации является обработка поверхности цианурхлоридом, который затем реагирует с олигонуклеотидом, имеющим концевую аминогруппу. К достоинствам методики можно отнести высокие значения плотности иммобилизации и низкую неспецифическую адгезию магнитных частиц, которая обеспечивается отсутствием сшивок между цепями целлюлозы.

Для проведения гибридационного анализа использовали описанную выше проточную ячейку, в которую помещали микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами. Перед анализом к фрагменту ДНК добавляли биотинилированный олигонуклеотид-адаптер и затем полученный комплекс концентрировали на микрочипе в электрическом поле. Для детекции сигнала использовали сканирование поверхности микрочипа магнитными частицами, покрытыми стрептавидином (рис. 11).

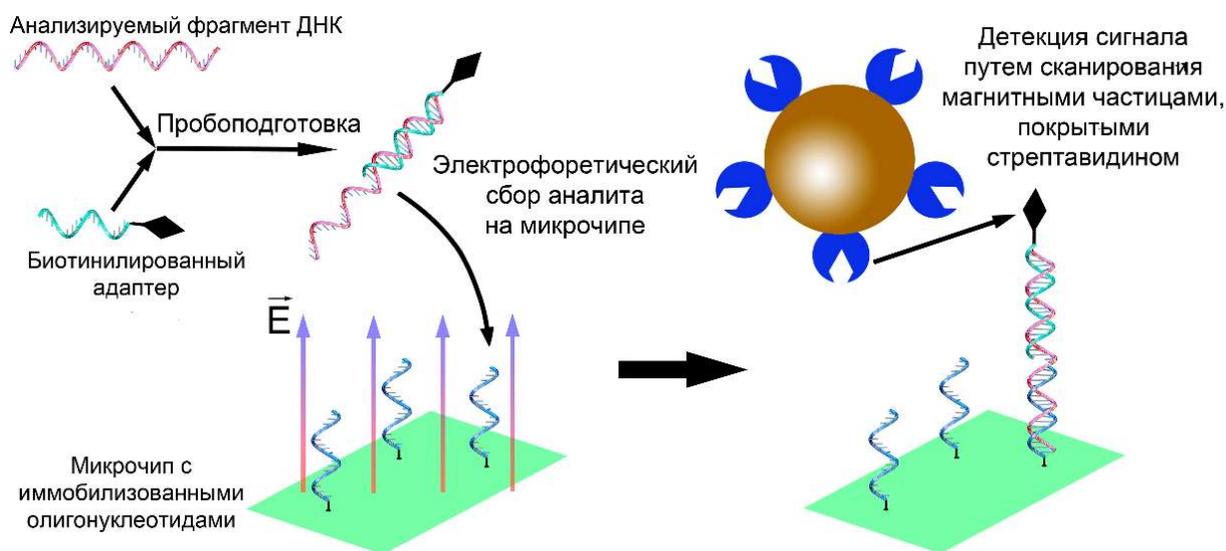


Рис. 11. Схема проведения ультрачувствительного гибридационного анализа. Перед анализом исследуемый фрагмент ДНК связывался с биотинилированным олигонуклеотидом-адаптером, полученный комплекс детектировался МЧ, покрытыми стрептавидином.

Надо отметить, что более простой протокол анализа без пробоподготовки с помощью МЧ, покрытых детектирующими олигонуклеотидами, не позволил детектировать сигнал даже при высоких концентрациях аналита и низких скоростях сканирования. Вероятно, это связано с недостаточной скоростью формирования ДНК-дуплексов, которые не успевают образоваться при контакте МЧ с поверхностью микрочипа. В связи с этим в дальнейшей работе использовался протокол с детекцией сигнала частицами, покрытыми стрептавидином (рис. 11), который быстро образует прочный комплекс с биотином. При использовании электрофоретического концентрирования рассчитанный ПрО для одноцепочечных фрагментов ДНК длиной 70 и 893 нуклеотидных остатка составил 0,1 фМ, что соответствует 6000 молекул аналита в образце. При

этом время анализа не превышало 10 мин. По результатам анализа, проведённого в тех же условиях, но без электрофоретического концентрирования, ПрО повысился в 1000 раз. Градуировочный график интенсивности сигнала от концентрации одноцепочечного фрагмента ДНК имел сигмоидную форму с динамическим диапазоном около 4-х порядков и выходом сигнала на насыщение при концентрации аналита ~1 пМ (рис. 12).

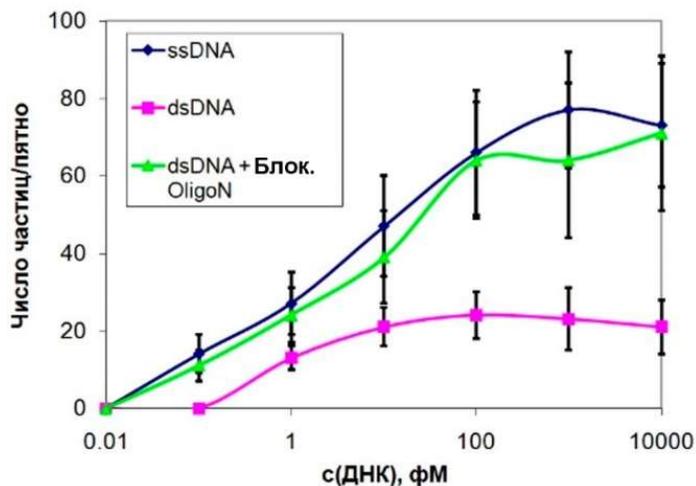


Рис. 12. Зависимость сигнала в "активном" гибридационном анализе от концентрации одноцепочечных (синяя кривая) и двухцепочечных фрагментов ДНК (зелёная кривая - в присутствии блокирующих олигонуклеотидов, сиреневая – в отсутствие блокирующих олигонуклеотидов). Пределы погрешности соответствуют $2,5 \times CO$.

Подобные градуировочные графики были получены ранее для иммунохимических тест-систем с детекцией сигнала магнитными метками. Сходство калибровочных кривых, наблюдаемых в разных типах анализа, свидетельствует об общности факторов, регулирующих связывание МЧ на микрочипе. К ним относятся плотность иммобилизации связывающих молекул, их стерическая доступность и шероховатость поверхности микрочипа и частиц. В то же время природа специфических связей в комплексе антиген-антитело или между комплементарными фрагментами нуклеиновых кислот, видимо, не играет существенной роли.

Детекция двухцепочечных фрагментов ДНК представляет гораздо больший практический интерес, однако для их анализа требуется дополнительная стадия пробоподготовки, генерирующая одноцепочечные фрагменты. Их получение предварительной денатурацией образца при 100 °С приводит к снижению значений сигнала и существенному повышению ПрО (рис. 12), вероятно, вследствие быстрого отжига расплавленных цепей. Для решения этой проблемы была разработана стратегия блокирования второй цепи, которая заключается в проведении денатурации в присутствии избытка (1 мкМ) блокирующих олигонуклеотидов, соответствующих определённым участкам ДНК (рис. 13); в этом случае ПрО составил 0,1 фМ.

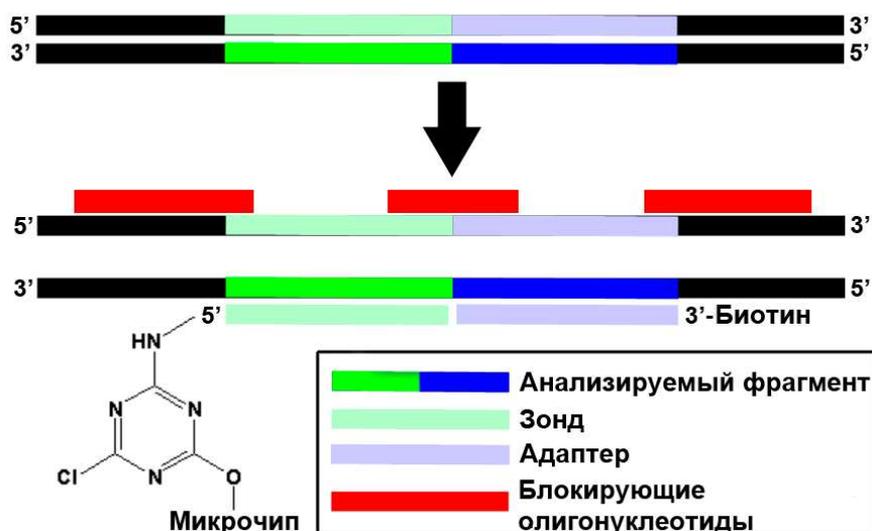


Рис. 13. Схема применения блокирующих олигонуклеотидов для анализа двухцепочечных фрагментов ДНК.

Так как градуировочные графики для исходных одноцепочечных и полученных путем плавления с блокирующими олигонуклеотидами фрагментов практически совпадают, можно сделать вывод, что блокирующие олигонуклеотиды полностью защищают анализируемый участок последовательности ДНК от отжига на комплементарную цепь. Таким образом, метод "активного" гибридационного анализа был адаптирован для детекции двухцепочечных фрагментов ДНК без существенного ухудшения аналитических характеристик - чувствительности, экспрессности анализа (дополнительная стадия занимает не более 1 мин) и динамического диапазона.

Наконец, было проведено прямое мультиплексное обнаружение бактериальных геномных ДНК в клеточных культурах микроорганизмов *M. neoaurum* (аналог возбудителя туберкулеза), *B. cereus* (модель возбудителя сибирской язвы) и кишечной палочки. Короткие фрагменты геномной ДНК (~1 тыс. пар нуклеотидов) получали ультразвуковой дезинтеграцией бактериальных клеток. Дизайн микрочипа для мультиплексного определения микроорганизмов представлен на рис. 14А. Анализ показал, что в 100 мкл образца можно обнаружить $\sim 10^4$ клеток каждого из микроорганизмов (рис. 14Б). Предполагая, что каждая клетка содержит одну копию гена, это соответствует чувствительности $\sim 0,1$ фМ, что совпадает с оценкой чувствительности анализа dsДНК. Таким образом, наличие в образце интерферирующих веществ, таких как денатурированные белки, фрагменты биологических мембран и клеточных стенок, а также большого избытка фрагментов ДНК и РНК, не влияет на чувствительность гибридационного анализа.

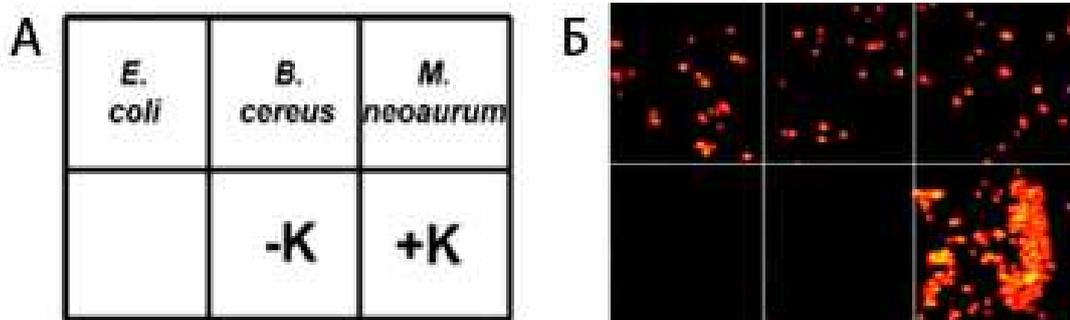


Рис. 14. (А) Дизайн микрочипа для одновременного обнаружения трёх микроорганизмов: *E. coli*, *D. cereus* и *M. neoaurum*. (Б) Результат гибридационного анализа образца, содержащего 10^4

клеток каждого из микроорганизмов. Объём образца - 100 мкл. Представлен фрагмент поверхности микрочипа. Размер рабочих зон - 100x100 мкм².

Показано, что метод обладает высокой специфичностью: ложноположительных сигналов не наблюдалось даже при концентрации клеток 10⁵/мкл. Следует отметить, что высокая специфичность анализа определяется как последовательностями зонда и адаптера, так и последовательностями блокирующих олигонуклеотидов.

Результатом исследования стало создание принципиально нового метода "активного" гибридизационного анализа, позволяющего обнаружить до 6000 молекул ДНК в 100 мкл раствора (~0,1 фМ) за 5 мин без усиления сигнала. Высокая чувствительность достигается с помощью активного способа проведения анализа под действием направленной силы: электрофоретического концентрирования анализируемых фрагментов и магнитного поля на стадии детекции мест отжига магнитными метками. Хотя разработанный метод имеет более высокий ПрО по сравнению с традиционными методами, использующих амплификацию сигнала, с его помощью можно одновременно анализировать сотни образцов. Он может найти применение в тех областях, где использование ПЦР затруднено в силу ограничений по мультиплексности, экспрессности анализа и пр. Еще одним вариантом использования разработанного метода является изучение процесса гибридизации - плавления молекул ДНК, контролируемого действием электрической силы. Этот подход может быть полезен для дальнейшего повышения специфичности анализа.

3. Новые методы ультрачувствительного иммуноанализа без использования электрофореза, пригодные для широкомасштабного практического применения

3.1. Низкоадгезивная подложка для микрочипов на основе плёнки из сшитой карбоксиметилцеллюлозы

В настоящей работе основным видом подложек для гетерофазного анализа является мембрана из регенерированной целлюлозы. Её ключевое достоинство - чрезвычайно низкая неспецифическая адгезия, в том числе, по отношению к белкам и МЧ. Вместе с тем для ряда практических целей гибкая подложка неприменима, и требуются микрочипы на твёрдой основе. Примером такой задачи является автоматическая установка для обнаружения особо опасных инфекций и патогенов на микрочипах с детекцией сигнала магнитными метками, разрабатываемая компанией «Инноград-Пушино» в рамках проекта, поддержанного Фондом «Сколково». Однако для анализа с детекцией магнитными метками предъявляются очень высокие требования к адгезионным свойствам поверхности, которым не удовлетворяют традиционные виды подложек, разработанные для гетерофазного анализа. В настоящей работе в качестве нового материала, обладающего низкой адгезией к магнитным меткам, была предложена термически сшитая карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ). Плёнка толщиной 0,3-0,5 мкм может быть получена на стандартном микроскопном стекле, обработанном 3-аминопропилтриэтоксисиланом, при растекании капли раствора КМЦ в процессе центрифугирования. Нагревание при 120-150 °С в течение 0,5-2 ч позволяет достичь высокой плотности ковалентных сложноэфирных сшивок (рис. 15А). Двумя независимыми способами - титрованием карбоксильных групп и измерением размеров пленки при набухании - было установлено значение плотности сшивки ~1 связь на 2 остатка глюкозы. Исследование плёнки из КМЦ методом АСМ показало, что она обладает гладкой поверхностью: шероховатость составила несколько нм (данные не приведены).

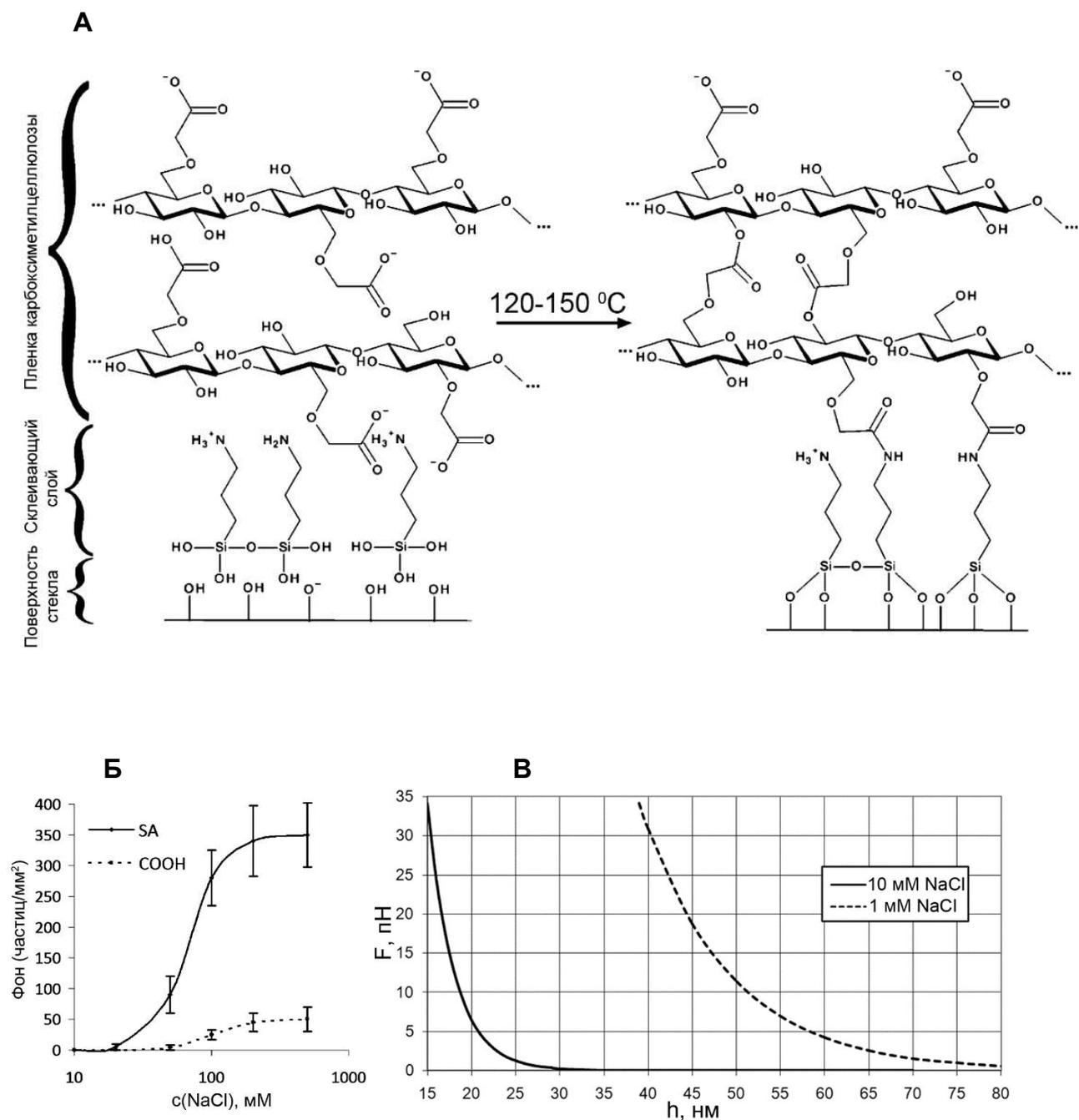


Рис. 15. (А) Схема образования ковалентных шивок в плёнке из КМЦ. (Б) Зависимость неспецифической адгезии МЧ с различным покрытием от ионной силы среды. (В) Расчётная зависимость силы электростатического отталкивания МЧ и поверхности КМЦ от расстояния при разных значениях ионной силы среды.

Установлено, что неспецифическая адгезия МЧ к такой поверхности зависит от ионной силы среды: при концентрации соли ниже 20 мМ адгезия полностью отсутствовала (рис. 15Б). Количественные оценки силы электростатического отталкивания, сделанные с применением теории ДЛФО и основанные на измеренных нами значениях дзета-потенциалов МЧ и плёнки из КМЦ, приведены на рис. 15В. При низкой ионной силе электростатическое отталкивание является слишком сильным и вынуждает МЧ скользить по поверхности на слишком большом для связывания расстоянии даже при действии магнитной силы. При более высокой ионной силе, соответствующей концентрации соли ~10 мМ, расстояние от поверхности КМЦ до МЧ, прижимаемой к поверхности силой 5-10 пН, составляет около 20 нм. Такое расстояние слишком велико для формирования неспецифических контактов большой площади, но позволяет

формироваться отдельным специфическим межмолекулярным взаимодействиям, таким как связи антиген-антитело.

Для демонстрации эффективности субстрата КМЦ в иммуноанализе использовали пару моноклональных антител против СТ и однокомпонентный микрочип с анти-СТ-антителами, изготовленный на плёнке методом ЭР. Анализ включал последовательное связывание СТ и биотинилированных анти-СТ-антител и определение связанного токсина сканированием в сдвиговом потоке поверхности микрочипа МЧ, покрытыми SA. При использовании буфера с концентрацией соли ниже 1 мМ, сигнал отсутствовал при любой концентрации СТ, что согласуется с приведёнными выше оценками. При концентрации соли 5 - 50 мМ наблюдался интенсивный сигнал, не зависящий от ионной силы (рис. 16А). Учитывая данные, приведенные на рис. 15Б, можно заключить, что концентрация соли в диапазоне 5-20 мМ может быть использована для иммуноанализа на КМЦ-микрочипах. Рассчитанный ПрО составил ~0,1 нг/мл. Сигналы, полученные с использованием одного и того же набора антител, на плёнке из КМЦ и на диализной мембране, были неразличимы, однако сигнал на 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 против 1 М в плёнке из КМЦ), можно предположить, что не электростатическое, а энтропийное отталкивание цепей целлюлозы ответственно за подавление фонового сигнала на диализной мембране.

Чтобы продемонстрировать работу микрочипа на основе КМЦ в мультиплексном анализе, были изготовлены 5-компонентные микрочипы для детекции бактериальных токсинов СТ, SEA и TSST. В этом случае вместо ЭР использовали бесконтактную печать с помощью специального принтера. Для всех токсинов ПрО составил ~0,1 нг/мл (~1 пМ) при полном сохранении высокой специфичности анализа: ложноположительных сигналов не наблюдалось при концентрациях аналитов до 1 мкг/мл.

Надо отметить, что микрочипы на основе КМЦ демонстрируют отличную стабильность при хранении. 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. Ввиду простого способа изготовления, применение КМЦ-микрочипов кажется весьма перспективным для иммуноанализа биомолекул с детекцией сигнала магнитными метками.

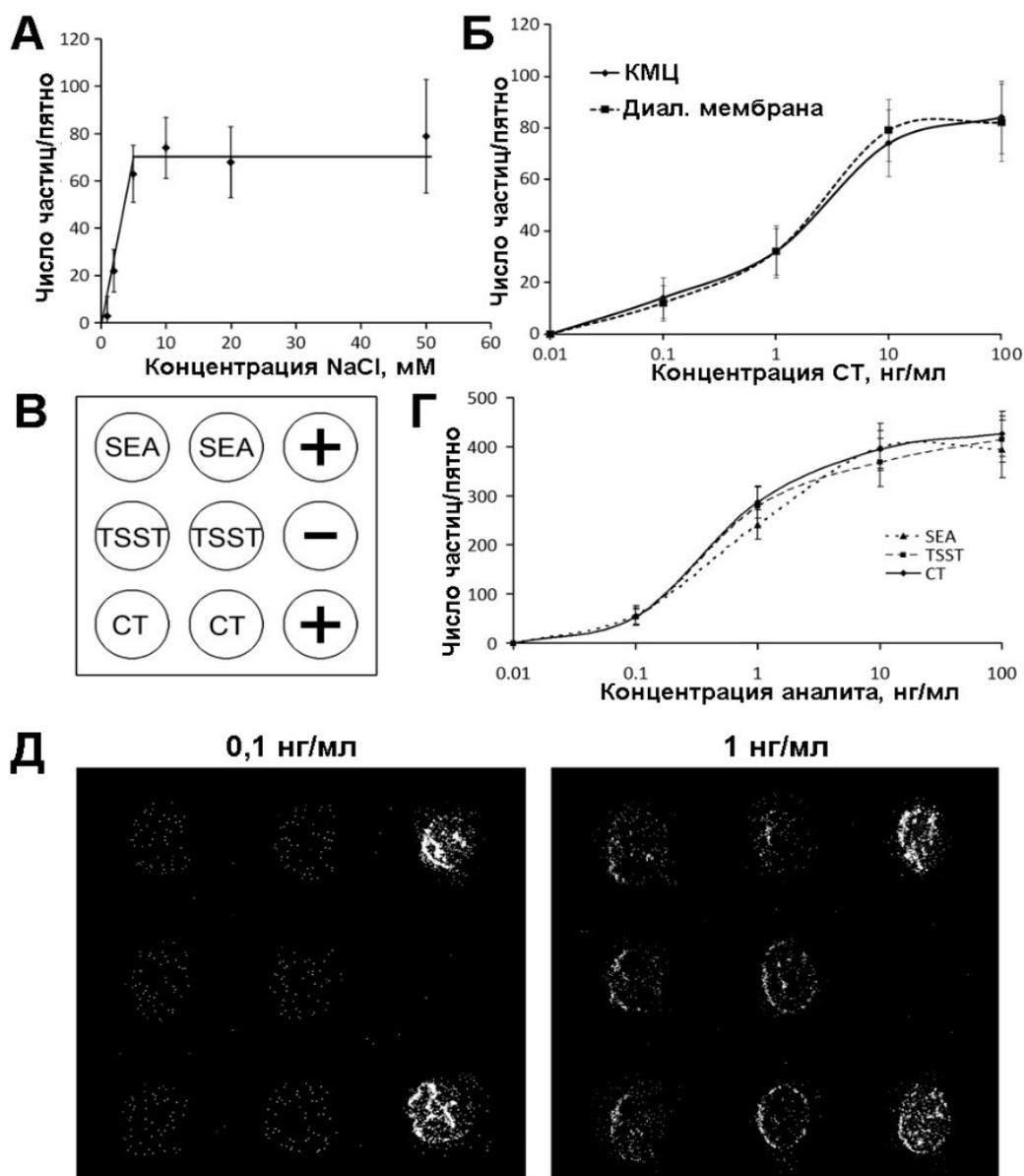


Рис. 16. Иммуноанализ СТ на микрочипах, изготовленных на подложке из КМЦ. (А) Зависимость сигнала на пленке из КМЦ от концентрации NaCl. Концентрация СТ - 10 нг/мл. Сканирование МЧ проводили в 0,1 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, 1% ПВП, 0,1% Твин-20 и NaCl. (Б) Зависимость сигнала на диализной мембране 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 указаны в верхней части рисунка.

3.2. Стратегия расщепляемого блокирования поверхности микрочипов для повышения эффективности иммуноанализа

Распространенными проблемами в технологии микрочипов являются ограничения на скорость массопереноса аналита к поверхности и высокий фоновый сигнал. В настоящей работе предложено решение, направленное как на ускорение массопереноса, так и на кардинальное снижение фона в гетерофазном анализе. Суть предложения заключается в формировании на поверхности микрочипа гидрофобного химически расщепляемого покрытия путем блокирования функциональных групп, непрореагировавших после ковалентной иммобилизации белков,

особым агентом – амином с перфторацильной группой, присоединенной через дисульфидный линкер. Схема синтеза блокирующего агента и процедура анализа показаны на рис. 17. Для удаления фторсодержащего покрытия дисульфиды расщепляли быстрой (5 мин) обработкой трис-(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР).

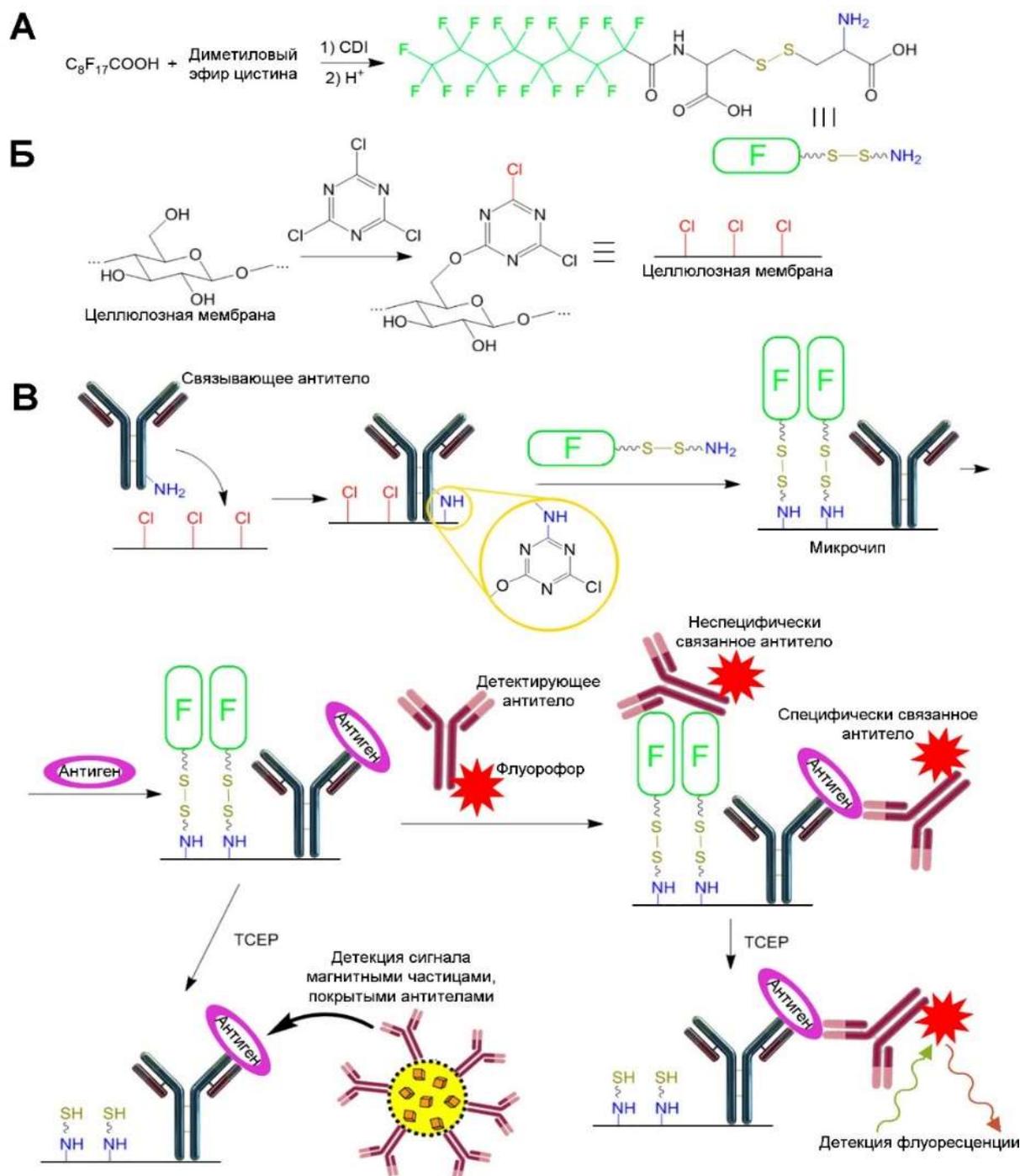


Рис. 17. Схема процесса изготовления микрочипа и процедуры иммуноанализа. (А) Синтез расщепляемого фторсодержащего амина; (Б) модификация мембраны цианурхлоридом; (В) процедура анализа: антитела иммобилизуют на активированной поверхности целлюлозы, после чего обрабатывают фторсодержащим амином. После связывания антигена и меченых детектирующих антител покрытие удаляется обработкой ТСЕР.

Свойства поверхности микрочипов исследовали на микроскопическом уровне, измеряя силу адгезии гидрофобного кантилевера в АСМ. Чем гидрофобнее поверхность, тем выше сила адгезии. На основании полученных значений силы сцепления были разделены на высокие (> 100 пН), средние (10-100 пН) и слабые (< 10 пН). Их пространственное распределение и частота встречаемости на различных участках поверхности показаны на рис. 18. После обработки ТСЕР области с высокой адгезией в активной зоне исчезали, подтверждая факт полного удаления покрытия. Большая часть поверхности становилась гидрофильной и имела низкую адгезию, необходимую для анализа с использованием МЧ.

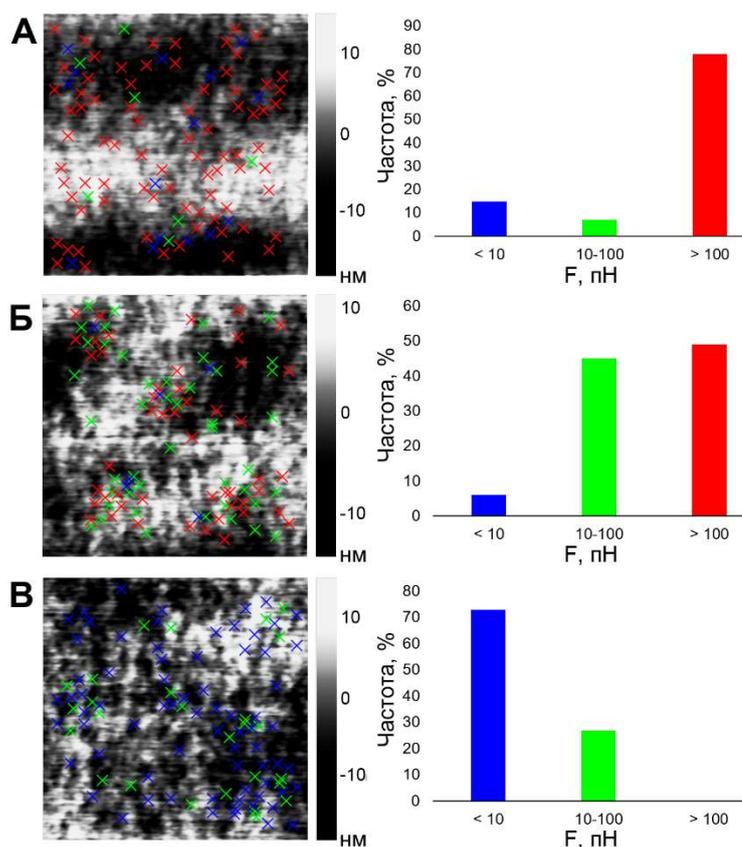


Рис. 18. Распределение сил адгезии гидрофобного кантилевера АСМ, измеренное на различных поверхностях: А) фоновая зона и Б) активная зона фторированного микрочипа; В) активная зона после обработки ТСЕР. В каждом случае проанализировано 100 позиций. Красные кресты соответствуют участкам с высокой ($F > 100$ пН), зеленые – со средней ($F = 10-100$ пН) и синие - со слабой адгезией ($F < 10$ пН). Площадь сканирования - 1×1 мкм². Гистограммы отображают доли участков с разной адгезией.

Полученные данные открывают путь к снижению фона в анализах на микрочипах: раз гидрофобное покрытие полностью удаляется с поверхности, то и все молекулы, неспецифически адсорбированные на этом покрытии, удалятся вместе с ним. Это предположение было подтверждено в иммунофлуоресцентном анализе холерного токсина и интерлейкина IL-1 β с использованием пар моноклональных антител. Расщепление покрытия перед детекцией сигнала позволило уменьшить как фон, так и отрицательный контроль в 30 раз по сравнению с контрольными экспериментами, иммуноанализом на целлюлозной мембране без покрытия и на микрочипе с нерасщепленным фторированным покрытием (рис. 19А). При этом важно отметить, что интенсивность сигнала практически не зависит от обработки ТСЕР (рис. 19Б). Это означает, что, хотя иммуноглобулины также содержат восстанавливаемые дисульфидные связи, ТСЕР не оказывает значительного влияния на активность связывающих антител.

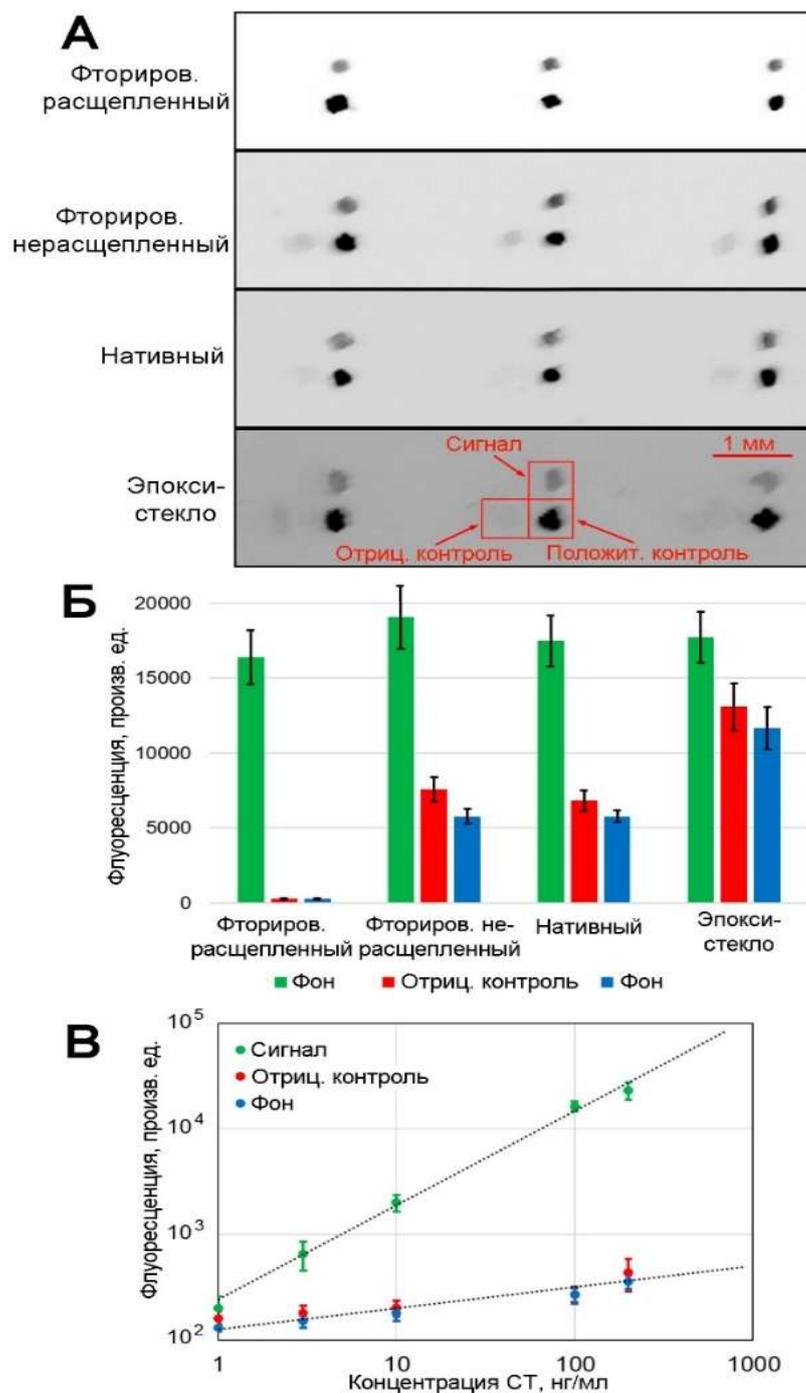


Рис. 19. (А) Иммунофлуоресцентный анализ СТ (100 нг/мл) с использованием различных субстратов: целлюлозная мембрана, блокированная фторсодержащим амином и обработанная ТСЕР; целлюлозная мембрана, блокированная фторсодержащим амином, но не обработанная ТСЕР; целлюлозная мембрана, блокированная этаноламином; стекло, модифицированное эпокси-группами. (Б) Сравнение значений сигнала, отрицательного контроля и фона для перечисленных субстратов. Интенсивность всех зон положительного контроля находилась за пределами диапазона измерений. (В) Градуировочный график для детекции СТ на фторсодержащих микрочипах, обработанных ТСЕР перед измерением флуоресценции. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$.

В анализе на микрочипах с расщепляемым фторированным покрытием другого белка, IL-1 β , значения как фонового сигнала, так и отрицательного контроля также уменьшились больше, чем в 10 раз. При этом уменьшение фона повысило чувствительность анализа. Для микрочипа на

модифицированном эпокси-группами стеклянном слайде ПрО оказался близок к 100 нг/мл, на целлюлозной мембране, блокированной этаноламином, - около 30 нг / мл, а с расщепляемым покрытием - 1-3 нг/мл (рис. 19В). Таким образом, был достигнут значительный выигрыш в эффективности анализа. То обстоятельство, что и фон, и сигнал отрицательного контроля мало зависят от концентрации аналита, указывает на то, что основным источником фона является неспецифическая адсорбция детектирующего антитела.

Еще одно применение предложенной концепции – это управление смачиваемостью поверхности микрочипа. В частности, обратимая гидрофобизация поверхности микрочипа даёт новое преимущество для иммуноанализов с магнитными метками, а именно, помогает ускорить массоперенос анализируемого вещества из объёма на поверхность микрочипа за счет процедуры циклического «стекания-восполнения», которую можно легко реализовать во вращающейся пробирке, содержащей образец. Если поверхность микрочипа гидрофобна, при стекании раствора на ней не остается неперемешиваемого жидкого слоя, и объём образца, контактирующий с микрочипом, регулярно обновляется. Однако любая гидрофобная поверхность имеет высокую неспецифическую адгезию МЧ. Здесь и помогает расщепляемая блокировка: после связывания аналита гидрофобный микрочип становится гидрофильным, что позволяет надёжно детектировать сигнал магнитными метками. Эффективность такого подхода показана иммуноанализом образцов, содержащих холерный токсин (рис. 20А).

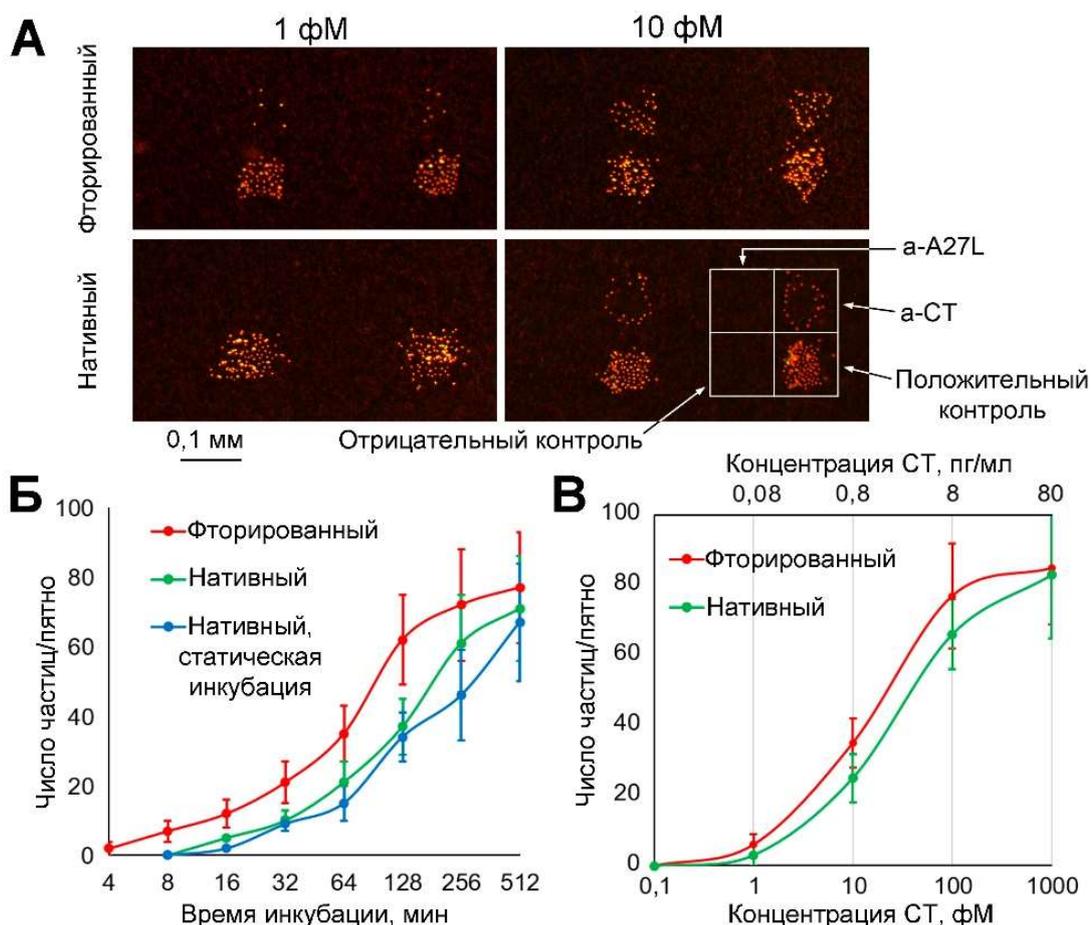


Рис. 20. (А) Результаты иммуноанализа после одночасовой инкубации с указанными концентрациями СТ на микрочипах с фторированным покрытием и без него. Положительный контроль - белок G, отрицательный контроль – БСА. (Б) Зависимость сигнала иммуноанализа СТ от времени инкубации при использовании процедуры циклического «стекания-восполнения» и статической инкубации. Концентрация СТ - 10 фМ. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$. (В) Градуировочные графики для иммуноанализа СТ на разных микрочипах при инкубации

в течение 1 часа с процедурой циклического «стекания-восполнения». Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$.

Применение расщепляемого покрытия ускоряет накопление анализита на микрочипе (рис. 20Б) и делает анализ в 2-3 раза более чувствительным (рис. 20В). При инкубации в течение 1 часа ПрО СТ на нативной мембране из целлюлозы составил ~ 3 фМ, а на микрочипе с расщепляемым покрытием - 1 фМ. Расчёты с использованием модели статической диффузии, плотности иммобилизации и константы связывания антитела с СТ дают минимальную детектируемую концентрацию СТ ~ 1 фМ, что совпадает с экспериментально установленным значением ПрО. Таким образом, в описанной системе с ускоренным массопереносом за один час инкубации достигается термодинамический предел обнаружения.

Еще более ярко преимущество ускоренного массопереноса проявляется в случае анализитов, имеющих низкий коэффициент диффузии, таких как целые вирусы. Обнаружение целых вирусных частиц имеет некоторые практические преимущества, в том числе из-за более простого протокола пробоподготовки и анализа. В настоящей работе в качестве модели использован вирус осповакцины с размером вириона около 300 нм. Как следует из данных на рис. 21, применение микрочипов с фторированным покрытием позволило снизить ПрО не меньше, чем на порядок. При времени инкубации 10 часов предел обнаружения достигает значения 10^4 вирусов/мл.

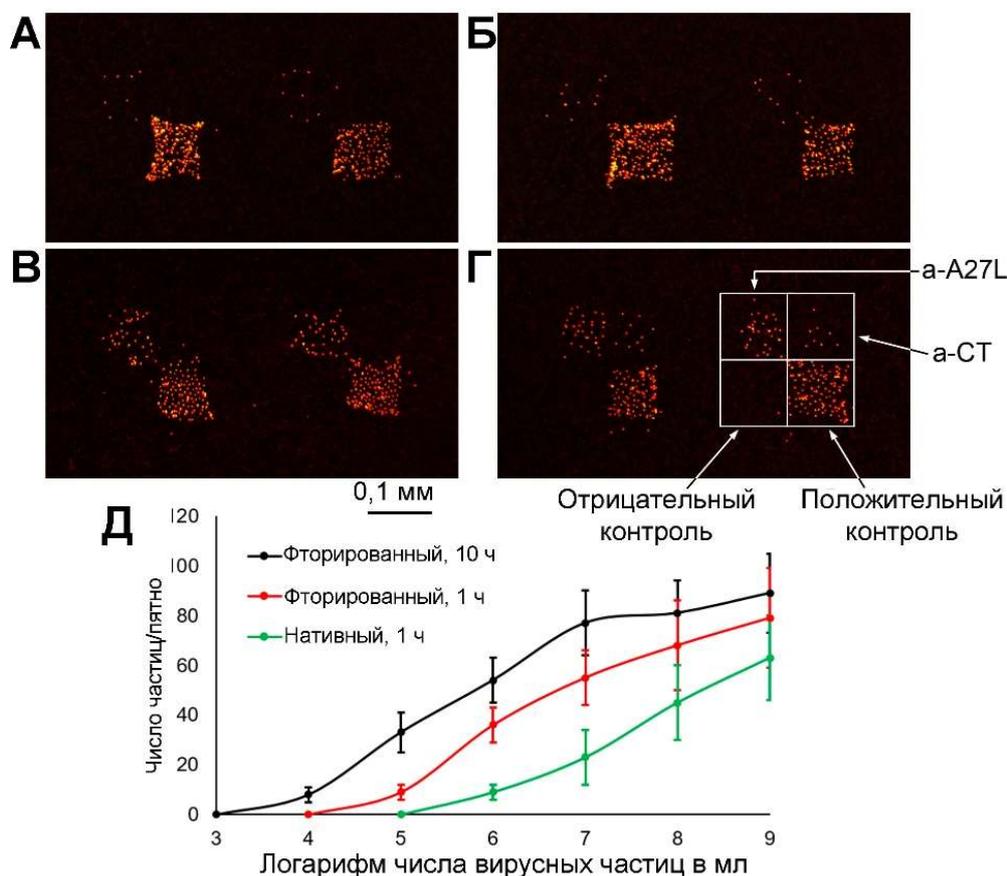


Рис. 21. Иммуноанализ частиц вируса осповакцины с использованием микрочипа с фторсодержащим покрытием: (А) 10^4 вирусных частиц в мл, время инкубации 10 часов; (Б) 10^5 вирусных частиц в мл, время инкубации – 1 час; (В) 10^6 вирусных частиц в мл, время инкубации – 1 час; (Г) одновременный иммуноанализ 6×10^5 вирусов осповакцины и 6×10^5 молекул СТ в мл (1 фМ), время инкубации – 1 час; (Д) градуировочные графики для иммуноанализа вируса осповакцины с использованием микрочипов с фторированным покрытием и «нативных» (изготовленных на целлюлозной мембране без покрытия) микрочипов с различным временем инкубации. Пределы погрешностей соответствуют $2,5 \times CO$.

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 аналитом 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. Её преимущество с другими широко используемыми методами детекции, в частности, основанными на усилении ферментативного хемилюминесцентного сигнала, составило как минимум 2 порядка. Кроме того, предложенный метод позволяет одновременно обнаруживать вирусы и другие биомаркеры в одном анализе при сохранении высокой специфичности. Описанная тест-система может иметь практическое значение для мультиплексного обнаружения опасных патогенов различной природы, таких как вирусы и бактерии. В таком случае вирусы анализируются напрямую, тогда как бактерии обнаруживаются по секретируемым белковым биомаркерам. Таким образом, предлагаемые инновации в технологии микрочипов и способе проведения анализа значительно улучшают его аналитические характеристики, а именно, снижают предел обнаружения за счёт уменьшения фонового сигнала и сокращают время анализа. Следует заметить, что самые современные форматы иммуноанализа часто включают сложное оборудование и приспособления, например, микрофлюидные чипы, которые контактируют с раствором образца. Если анализируются опасные патогены, это оборудование надо подвергать дополнительным процедурам мойки/дезинфекции. Напротив, особенность предлагаемой методики состоит в том, что во время анализа образец остаётся в исходной одноразовой пробирке. Подход, развитый в настоящей работе, может быть использован также для контроля прикрепления клеток или в методах разделения для контролируемого и количественного высвобождения адсорбированных веществ с поверхности адсорбента. Возможно его применение не только *in vitro*, но и *in vivo*, например, для регулирования свойств поверхности наночастиц, используемых в качестве диагностических или фармацевтических инструментов, поскольку дисульфидные линкеры покрытия могут расщепляться внутриклеточным глутатионом при поглощении наночастиц клетками.

3.3. Применение иммуноанализа на микрочипах для неинвазивной диагностики урологических онкозаболеваний по детекции раково-сетчаточных антигенов в моче

Одной из социально значимых проблем, на решение которых могут быть направлены новые биоаналитические методы, является малоинвазивная диагностика онкологических заболеваний по специфическим биомаркерам, в том числе, белковой природы. Для урологических онкозаболеваний наиболее перспективным представляется поиск новых биомаркеров и их определение в моче. Можно ожидать, что более чувствительные методы иммуноанализа по сравнению с общепринятыми могут выявить новые диагностические биомаркеры, присутствующие в биологических жидкостях в низких концентрациях. Известно, что некоторые белки, в норме содержащиеся исключительно в нервной ткани (так называемые раково-сетчаточные антигены), могут экспрессироваться в опухолях. Целью данной части работы было выявление следовых количеств некоторых раково-сетчаточных антигенов в моче и сыворотке крови больных почечно-клеточным раком (ПКР), раком мочевого пузыря (РМП) и раком предстательной железы (РПЖ) с помощью ультрачувствительного иммуноанализа на микрочипах с детекцией магнитными метками. В исследование были включены 89 пациентов с РП, 40 больных РМП, 40 больных РПЖ и 50 урологических больных без злокачественных образований. Образцы собирали до нефрэктомии и неделю спустя после операции.

Для исследования были отобраны следующие раково-сетчаточные антигены: аррестин, рековерин, родопсинкиназа и трансдуцин, для которых удалось подобрать рабочие пары антител в сэндвич-иммуноанализе. Метод ультрачувствительного иммуноанализа был максимально адаптирован для работы с большим числом потенциально опасных биологических образцов: микрочипы инкубировались во вращающихся пробирках с образцами, отмывались и

фиксируются в проточной ячейке, в которой осуществлялось сканирование микрочипов МЧ, покрытыми специфическими антителами. Дизайн микрочипа (рис. 22А,Б) позволил максимально упростить задачу его позиционирования в ячейке и последующий анализ изображений. ПрО для всех аналитов составил $\sim 0,1$ пг/мл или ~ 1 фМ (рис. 22В). Применение усовершенствованной процедуры оценки сигнала, учитывающей не только число связавшихся частиц, но и их распределение по активной зоне, позволило измерять концентрации аналита в диапазоне 0,1-10 пг/мл с точностью 0,5 десятичных порядка (рис. 22Г).

Результаты иммуноанализа мочи больных раком почки приведены на рис. 23. Значения AUC (площадь под ROC-кривой) отражают диагностическую эффективность биомаркера. Из рис. 23 следует, что два антигена – родопсинкиназу и трансдуцин можно исключить из рассмотрения ввиду их низкой эффективности (по построению ROC-кривой, при AUC=0.5 предиктивная способность биомаркера равна нулю).

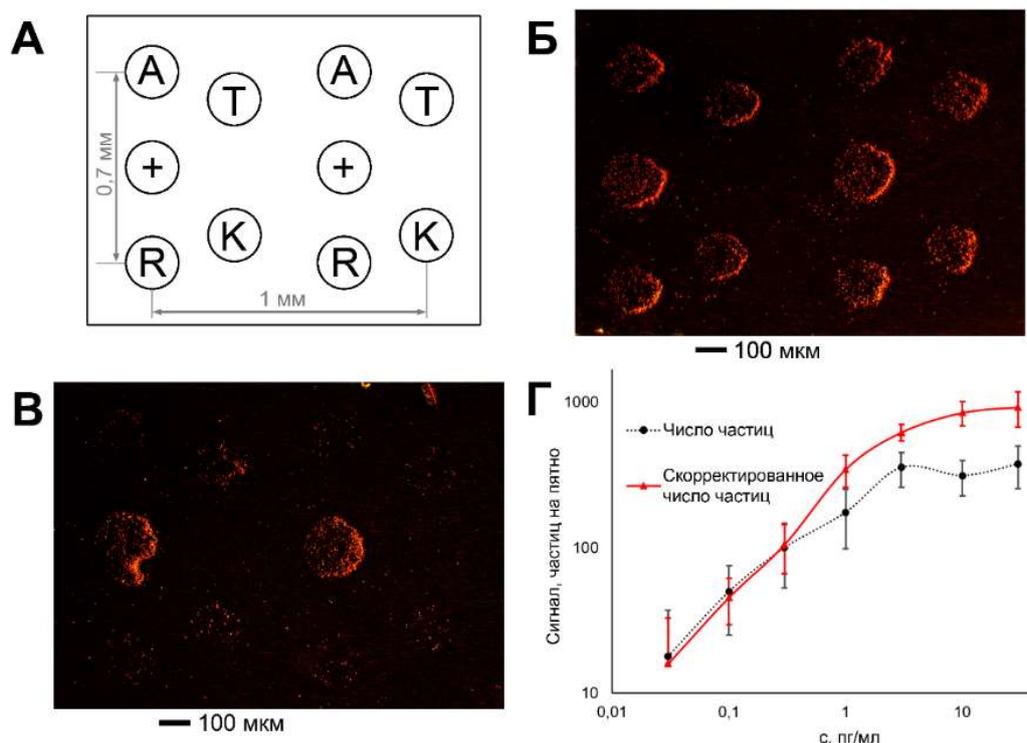


Рис. 22. (А) Дизайн микрочипа, используемого в иммуноанализе. А, R, К и Т обозначают зоны антител, специфичных к аррестину, рековерину, родопсинкиназе и трансдуцину соответственно; знак + означает положительный контроль (рекомбинантный рековерин); (Б, В) Изображения микрочипов, полученные при одновременном иммуноанализе 0,1 нг/мл (Б) и 0,1 пг/мл (В) каждого из четырех аналитов; (Г) Градуировочные графики, общие для всех аналитов, основанные на методе расчёта сигнала по количеству частиц в пятне (пунктирная чёрная кривая) и по скорректированной методике (сплошная красная кривая). Пределы погрешности соответствуют $2,5 \times CO$.

Результаты тестирования больных ПКР показали, что самую высокую диагностическую эффективность имеет комбинация двух антигенов - аррестина с рековерином. Значение AUC для аррестина составило 0,93 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,89–0,97), для рековерина – 0,82 (95% ДИ 0,75–0,89), а для их комбинации – 0,96 (95% ДИ 0,93–0,99) (рис. 23).

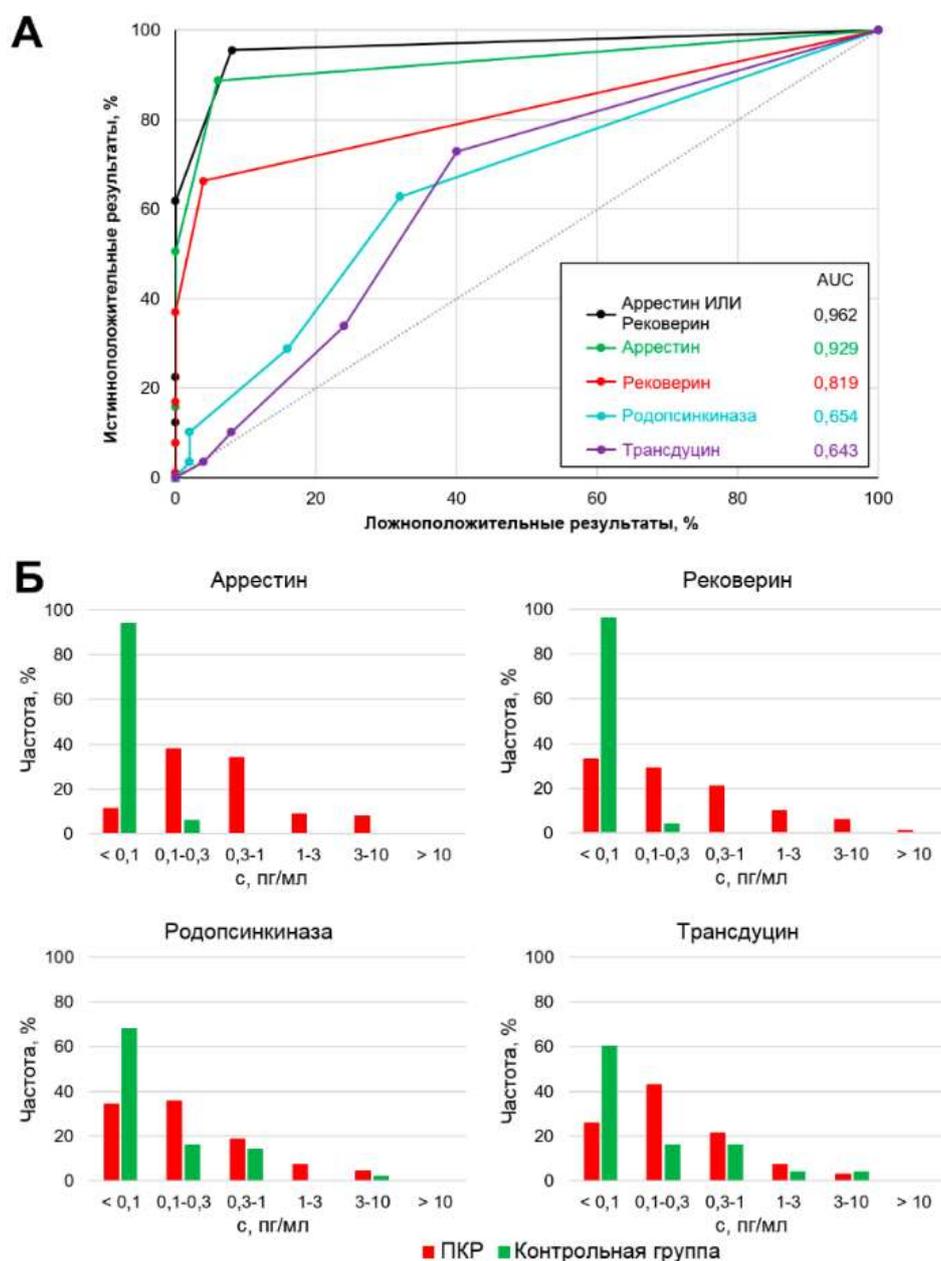


Рис. 23. (А) ROC-кривые для обнаружения четырех раково-сетчаточных антигенов в моче больных ПКР. Размер выборки: 59 (родопсинкиназа и трансдуцин) и 89 (аррестин и рековерин) пациентов с ПКР, а также 50 контролей. (Б) Распределение концентраций антигенов в моче пациентов с ПКР (красный) и контрольной группы (зеленый). Значения р-критерия χ^2 для различий между ПКР и контрольной группой: $< 10^{-10}$ для аррестина и его комбинации с рековерином, 10^{-9} для рековерина, 0,02 для родопсинкиназы и 0,01 - для трансдуцина.

В таблице 2 суммированы данные, полученные для разных урологических онкозаболеваний. При выбранном пороге 0,1 пг/мл при РМП диагностическая чувствительность определения комбинации антигенов составила 58%, при РПЖ – 60%, в то время как для ПКР это значение близко к 96%. Диагностическая специфичность определения комбинации антигенов для всех видов рака составила 92%. Соответствующие ROC-кривые приведены на рис. 24.

Таблица 2. Показатели эффективности диагностики урологических онкозаболеваний по аррестину, рековерину и их комбинации.

Биомаркер	Характеристика	ПКР	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)
РеCOVERин	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 реCOVERином	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)

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

² В скобках указаны значения для 95% ДИ.

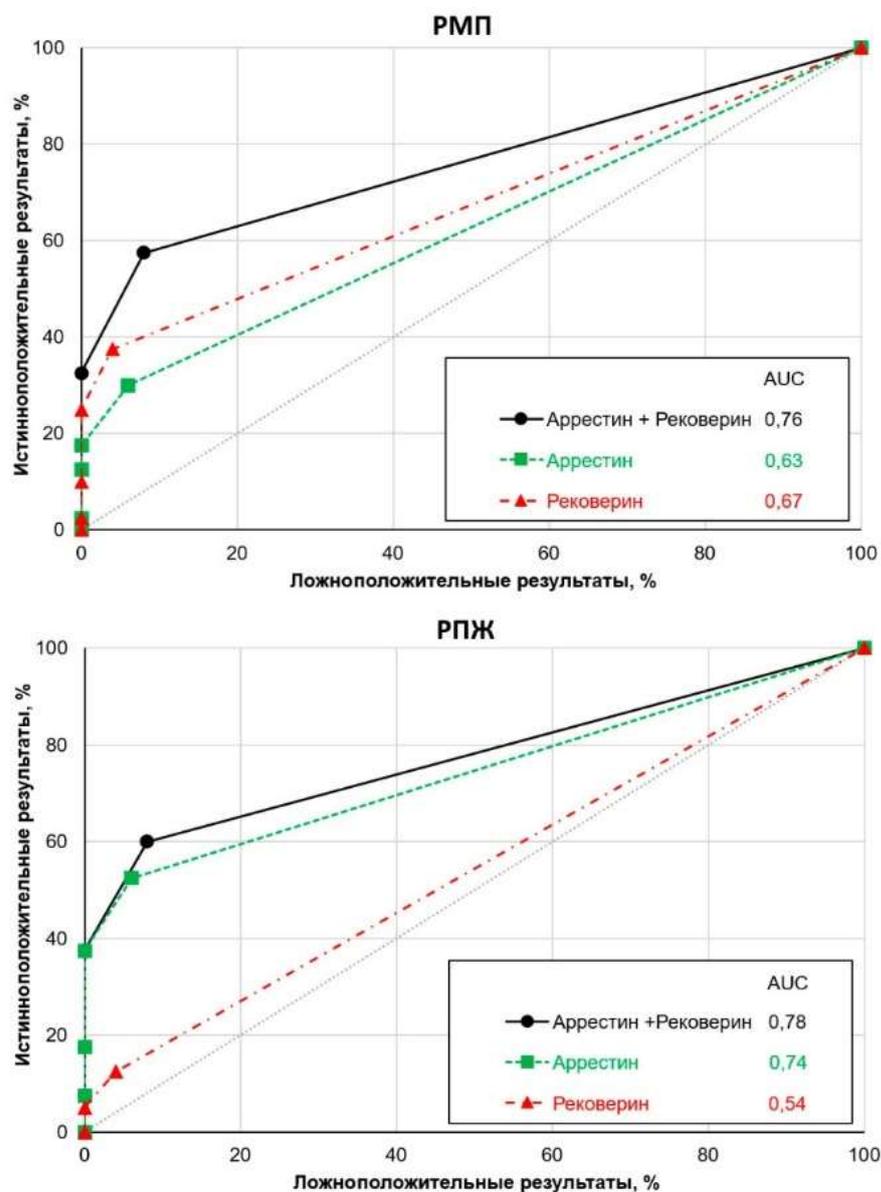


Рис. 24. ROC-кривые для диагностики РМП и РПЖ по аррестину, реCOVERину и их комбинации.

Содержание раково-сетчаточных антигенов было также определено в образцах мочи, полученных через неделю после хирургического удаления опухолей ПКР, РМП и РПЖ. Показано, что в этом случае концентрации антигенов возвращаются к значениям, характерным

для контрольной группы. Таким образом, данные антигены в перспективе могут использоваться для контроля хода лечения, а также для доклинического выявления рецидивов заболевания.

В результате, было показано, что ультрачувствительные методы иммуноанализа позволяют обнаружить новые эффективные онкомаркеры, которые не могут быть детектированы традиционными методами, такими как ИФА или Вестерн-блот, так как их концентрации в биологических образцах крайне малы. Определенные в данной работе показатели диагностической чувствительности и специфичности для детекции аррестина и рековерина в моче больных ПКР являются одними из лучших среди опубликованных значений для диагностики ПКР по белковым онкомаркерам.

4. Новые форматы электрофоретического разделения и концентрирования белков с их применением в ультрачувствительном иммуноанализе

В данной главе рассматриваются новые электрофоретические устройства для разделения и концентрирования биомолекул, а также новые аналитические методы на их основе.

4.1. Проточная ячейка для электрофоретического сбора анализа на магнитных частицах

Комбинация электрического и магнитного полей в иммуноанализе на микрочипах обеспечивает дополнительную возможность: молекулы анализа можно собирать не только на поверхности микрочипа, но и на поверхности МЧ. Достоинством такого варианта анализа является простота технической реализации, например, в автоматических иммунохимических анализаторах. Для обеспечения низкого значения ПрО, очевидно, имеет смысл использовать как можно меньшее количество магнитных меток, чтобы число молекул анализа, приходящееся на одну частицу, было максимальным. Но так как среднее расстояние между частицами в суспензии при этом увеличивается, диффузионное связывание анализа на их поверхности становится неэффективным. Для решения этой задачи и было сконструировано устройство, которое позволяет с высокой эффективностью проводить сбор анализа на поверхности МЧ.

Основным элементом устройства является жёлоб, образуемый двумя диализными мембранами (рис. 25), в котором происходит одновременное концентрирование заряженного анализа (в электрическом поле) и магнитных частиц (в магнитном поле), что существенно увеличивает скорость их связывания. Проточная ячейка состоит из каналов с электродами, которые создают электрическое поле, перпендикулярное потоку жидкости. Для создания высокого градиента магнитного поля использовали магнитный концентратор с острым наконечником. Движение МЧ вдоль жёлоба осуществляется под действием вязкой силы со стороны потока жидкости в непрерывном режиме. Далее МЧ со связанным анализом из жёлоба попадают в проточную ячейку с микрочипом, описанную ранее (на рис. не показана).

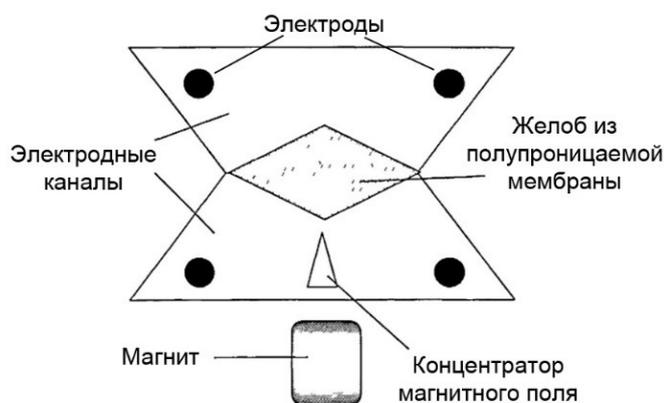


Рис. 25. Схематическое изображение сечения проточной ячейки для электрофоретического сбора анализа на магнитных частицах. Через электродные каналы пропускается буферный раствор.

Работоспособность метода была подтверждена обнаружением следовых количеств стафилококкового энтеротоксина SEА. 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. В проточной ячейке магнитные частицы сканировали поверхность микрочипа, на котором были иммобилизованы специфические антитела к SEА. Регистрацию связавшихся в активных зонах МЧ проводили с помощью микроскопа с темнопольным осветителем и цифровой камерой. 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.

4.2. Конический электрофоретический концентратор для заряженных биомолекул

Предварительное концентрирование пробы часто используется при проведении анализа сильно разбавленных растворов аналита. Новый способ электрофоретического концентрирования биомолекул обладает высокой эффективностью за счёт использования конической камеры из диализной мембраны (рис. 26).

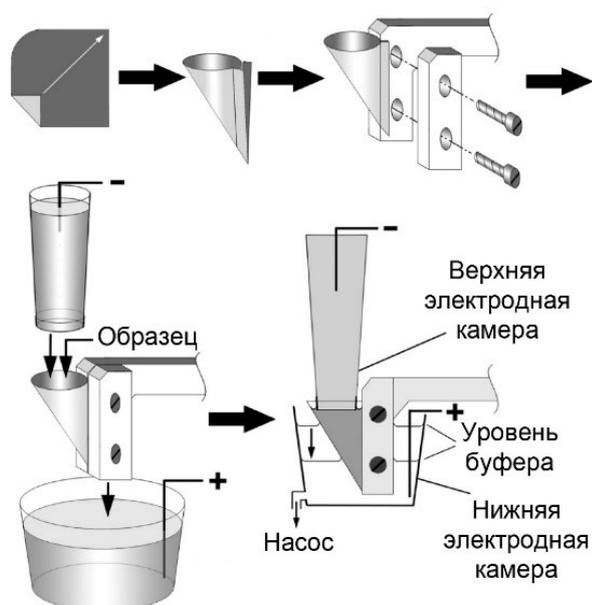


Рис. 26. Конструкция устройства для концентрирования биомолекул. Коническая ячейка формируется из листа диализной мембраны, зажимается в держателе и помещается в

камеру для электрофореза. В ячейку загружают образец, включают напряжение и откачивают раствор из нижней камеры с помощью насоса.

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. 27 показано, что при понижении уровня электродного буфера во внешнем сосуде максимум напряжённости электрического поля движется вниз, увлекая за собой заряженные макромолекулы. Таким образом, электрофоретическое концентрирование в конической ячейке объединяет преимущества свободного электрофореза (широкий выбор буферов) и изотахофореза.

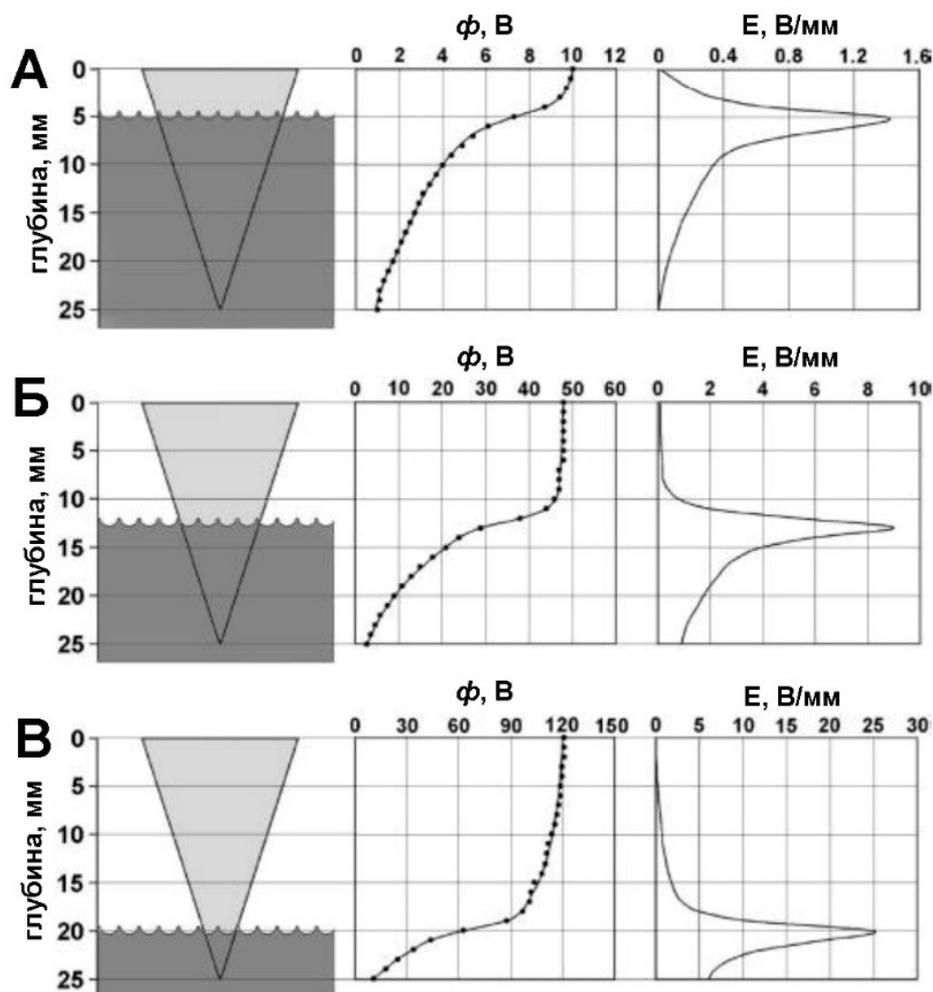


Рис. 27. Распределение электрического поля внутри конической ячейки во время электрофореза с разным уровнем буфера в нижней электродной камере. Глубина погружения измерительного электрода: (А) 5.0, (Б) 12.5 и (В) 20.0 мм. Напряжённость электрического поля, E , определяли дифференцированием сглаженных зависимостей потенциала от глубины, приведённых на средних панелях. Напряжение - 200 В.

Чтобы предотвратить перегрев образца при электрофорезе, необходим буферный раствор с низкой проводимостью. Прочие условия электрофоретического концентрирования (полярность подключения электродов, значение рН) определяются, в частности, изоионной точкой биомacroмолекул. На рис. 28А приведён результат концентрирования образца ФИТЦ-БСА, выбранного в качестве модельного белка из-за интенсивной окраски. При рН 8,5 ФИТЦ-БСА заряжен отрицательно и эффективно собирается в вершине конуса при приложении

положительного потенциала к раствору, находящемуся в нижней электродной камере. Однако концентрирование положительно заряженных белков, например, цитохрома с ($pI \sim 10$), с использованием ячейки из нативной целлюлозной мембраны при отрицательном потенциале в нижней электродной камере оказалось невозможно. 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 (рис. 28Б), и который размывает слой положительно заряженных молекул белка. 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. Для подтверждения этой гипотезы, для концентрирования цитохрома с использовали положительно заряженную мембрану, полученную модификацией исходной диализной мембраны спермидином. Показано, что с применением такой мембраны концентрирование цитохрома с проходит успешно.

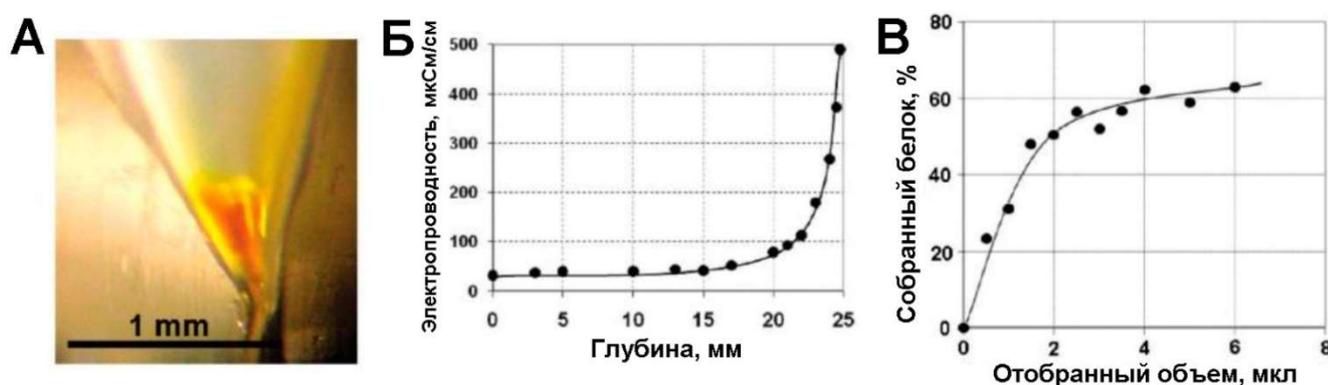


Рис. 28. Концентрирование в конусе из диализной мембраны и эффекты поляризации. (А) Изображение 1 мкг сконцентрированного ФИТЦ-БСА в пиридин-боратном буфере, рН 8,5. (Б) Зависимость проводимости раствора ФИТЦ-БСА после 15-минутного концентрирования белка (0,5 мкг/мл) от глубины погружения электрода. (В) Эффективность сбора ФИТЦ-БСА в зависимости от общего объёма аликвот, взятых из вершины конуса.

После концентрирования белок собирается в чрезвычайно малых объёмах (10-20 нл), что соответствует степени концентрирования $\sim 10^5$ раз. Однако в полной мере использовать столь высокую степень концентрирования затруднительно. Например, при отборе сконцентрированного белка из вершины ячейки с помощью шприца, в 5 мкл раствора содержится всего 60% от его исходного количества (рис. 28В). Чтобы повысить эффективность сбора, была разработана новая методика. Для этого в вершину конуса предварительно помещали активированные МЧ, способные ковалентно связывать белковые молекулы (рис. 29). Для демонстрации разработанного метода, известные количества h-IgG были сконцентрированы в конической ячейке, в вершине которой находились карбоксилированные МЧ, активированные EDC/NHS. По окончании процесса МЧ извлекали из ячейки и анализировали на микрочипе с иммобилизованными антителами к h-IgG. Полученное значение PrO h-IgG составило 0,5 пг/мл (3 фМ). Подходящим биологическим объектом для изучения с помощью разработанного метода является конденсат выдыхаемого воздуха, для которого характерны сильное разбавление ценных белковых биомаркеров, содержащихся в лёгочной жидкости, и низкая электропроводность. С применением этого метода в образцах конденсата выдыхаемого воздуха был детектирован h-IgG в концентрациях порядка нг/мл.

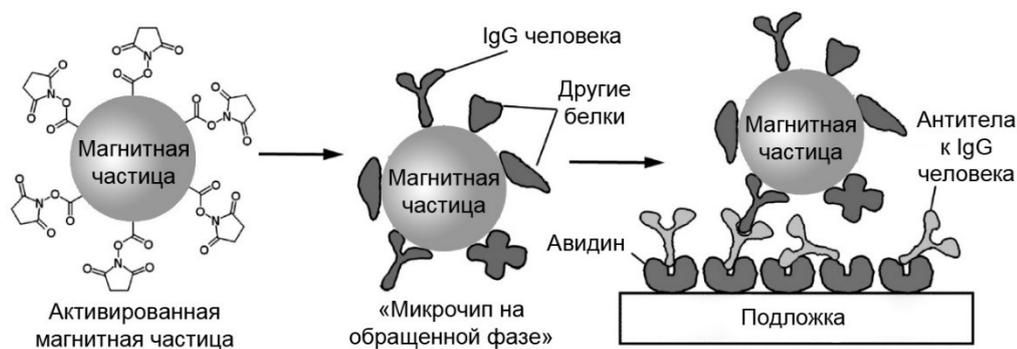


Рис. 29. Принцип детекции собранных белков с помощью МЧ на примере анализа h-IgG. Активированные карбоксилированные частицы помещаются в вершину конуса. После сбора белка МЧ связываются на микрочипе со специфическими антителами анти-h-IgG.

Таким образом, разработан быстрый и высокоэффективный метод электрофоретического концентрирования заряженных макромолекул в конической ячейке из диализной мембраны. Показано, что белки могут быть сконцентрированы в течение 12-15 мин в 10^5 раз и собраны из нанолитрового объёма с помощью активированных МЧ. Присутствие связанных определённых молекул белка может быть выявлено с помощью специфической реакции с антителами, иммобилизованными на микрочипе. Такой формат «микрочипа на обращенной фазе» может быть использован для исследования сильноразбавленных образцов, таких как конденсат выдыхаемого воздуха. Метод концентрирования биомолекул в конической ячейке может быть использован также в препаративных целях, при кристаллизации белков и для решения ряда других задач.

4.3. Быстрый ультрачувствительный метод иммуноблоттинга с фотохимической иммобилизацией *in situ* белков и магнитными метками

Применение магнитных меток позволяет улучшить аналитические характеристики не только в анализах на микрочипах, но и в других форматах гетерофазного анализа, в частности, в иммуноблоттинге. Вестерн-блот широко распространён в молекулярной биологии и медицине, однако существуют исследовательские задачи, для которых он непригоден из-за низкой чувствительности. Примером является анализ образцов лёгочной жидкости, собранных из выдыхаемого воздуха, которые могут содержать фемтограммовые количества биомаркеров. В данной части работы представлен быстрый и высокочувствительный метод иммуноблоттинга с магнитными метками без электрофореза в геле. Поверхность мембраны предварительно модифицировали азидофенильными группами для фотохимической иммобилизации белков *in situ*. Электрофоретическое разделение образца проводили в неденатурирующих условиях в зазоре между соприкасающимися целлюлозными мембранами. После разделения белки ковалентно иммобилизовали на поверхности кратковременным УФ-облучением. Для детекции аналита использовали проточную ячейку, в которую устанавливали мембрану с иммобилизованными белками. В этом случае исключается дополнительная стадия переноса белка из геля на мембрану. Белковые полосы визуализировали сканированием поверхности мембраны покрытыми специфическими антителами магнитными частицами, движущимися в ламинарном потоке и магнитном поле (рис. 30).

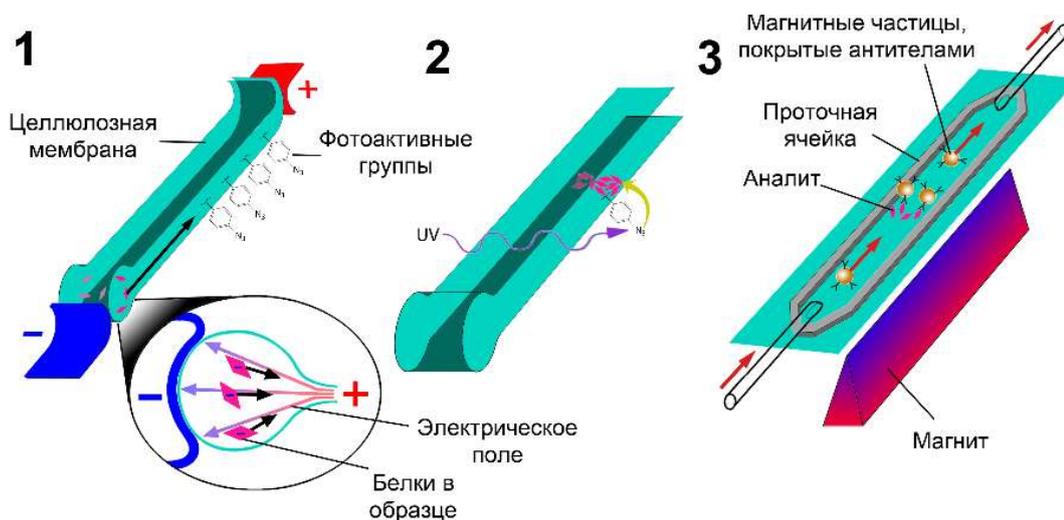


Рис. 30. Иммуноблоттинг с магнитными метками. 1 - Белковые молекулы электрофоретически концентрируются на входе в зазор между мембранами и движутся в зазоре. 2 - Разделённые белки иммобилизуются на модифицированной азидофенильными группами мембране под действием УФ-света. 3 - Аналиты детектируются сканированием поверхности МЧ, покрытыми специфическими антителами, в сдвиговом потоке.

В качестве модельной системы в работе использовали интерлейкин IL-1 β , который может являться информативным биомаркером воспаления, и специфичное к нему моноклональное антитело. Фотохимическая иммобилизация *in situ* не требует блокировки/деактивации поверхности микрочипа после связывания аналита и обеспечивает более простой и быстрый протокол. Измеренное значение плотности иммобилизации белка составило ~ 300 нг/см², что соответствует полному заполнению поверхности молекулами белка. В случае нанесения на мембрану чистого белка без электрофоретического разделения («дот-блот» анализ с магнитными метками) ПрО составил 0,1-0,3 фг или менее 10^4 белковых молекул. Высокая чувствительность в сочетании с простотой и быстротой эксперимента делает этот подход самостоятельным ценным аналитическим инструментом, если в образце нет веществ, способных помешать анализу. Однако такие вещества могут присутствовать в реальных биологических образцах. Если перед анализом IL-1 β был добавлен к образцу выдыхаемого воздуха, наблюдалось повышение ПрО на два порядка. Вероятно, некоторые компоненты, присутствующие в сложной смеси, мешают ковалентной иммобилизации аналита. Для решения этой проблемы в процедуру анализа был введен дополнительный этап электрофоретического разделения образца перед фотохимической иммобилизацией. Конструкция разработанного устройства для проведения электрофореза представлена на рис. 31. При электрофорезе белковые молекулы движутся вдоль границы раздела целлюлоза-вода в водном слое, который присутствует между соприкасающимися гидрофильными мембранами. Толщина слоя была оценена двумя независимыми методами и составила ~ 1 мкм. Характерное время диффузии для таких расстояний составляет менее 1 с, что позволяет быстро и эффективно иммобилизовать белки из зазора на поверхности мембраны. Однако при использовании нативной коммерческой мембраны подвижность белка во время электрофореза изменялась невоспроизводимым образом, что было объяснено «застреванием» белковых молекул в дефектах поверхности мембраны в ходе электрофореза. Чтобы избавиться от неровностей, была разработана методика сглаживания поверхности путём нанесения «лакирующего» слоя целлюлозы из раствора в системе диметилацетамид-LiCl. По данным АСМ, наблюдаемый масштаб гранулярности после этой процедуры составлял 5–10 нм, что сопоставимо с размером белковых молекул. Подвижность белка при разделении на сглаженной мембране была воспроизводимой и составила $(1,0-1,2) \times 10^{-4}$ см²/В с, что в 2-3 раза ниже, чем подвижность в растворе. Это приводит к концентрированию белка на входе в зазор и к сужению полос.

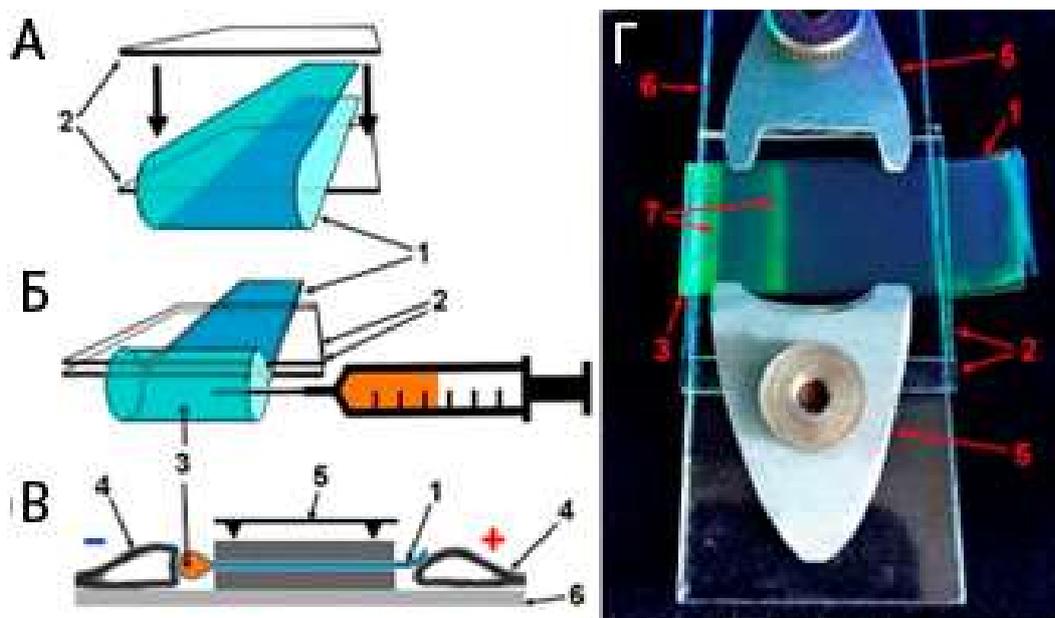


Рис. 31. Схема (А-В) и фотография (Г) устройства для электрофореза. (А) Мембрана (1) зажимается между предметными стеклами (2). (Б) Образец загружается в петлю (3). (В) Мембрана устанавливается между бумажными электродами (4) и фиксируется с помощью винтов (5) на опоре (6). (Г) Фотография устройства, сделанная при УФ-освещении; на мембране хорошо видны полосы ФИТЦ-БСА (7).

Анализ образцов выдыхаемого воздуха человека с добавлением IL-1 β показал ПрО 0,1-0,3 фг или менее 10^4 молекул (рис. 32А), как и в случае чистого белка. В то же время сигнал отсутствовал, если IL-1 β не был добавлен к тому же образцу (рис. 32Б). Таким образом, электрофоретическое разделение образца позволяет успешно отделить аналит от избытка веществ, мешающих анализу. Вместе с тем, положение белковой полосы на электрофореграмме в данном методе не столь информативно, как в случае традиционного Вестерн-блота, так как электрофорез проводится в неденатурирующих условиях.

Визуализацию белковых полос с помощью МЧ можно осуществлять не только сканированием в проточной ячейке, но и более простым методом “push-pull”, включающим покрытие поверхности мембраны суспензией МЧ с последующим удалением несвязавшихся МЧ подносимым сверху магнитом. Значение ПрО в этом случае возрастает до 10 фг, однако преимуществом такого варианта анализа является техническая простота. При этом чувствительность метода остается достаточной, например, для детекции общего IgA в образцах выдыхаемого человеком воздуха.

Изменяя диаметр петли, можно анализировать образцы разных объемов – от 1 до 30 мкл. Показано, что интенсивность сигнала не изменялась с увеличением объема образца в 10 раз при условии, что общее количество аналита в нем оставалось тем же. В пересчете на концентрацию предел обнаружения составил 10 фг/мл (0,5 фМ) при анализе образца объемом 30 мкл. Таким образом, новое электрофоретическое устройство обеспечивает не только разделение белков, но и их быстрое концентрирование при входе в зазор; при этом полученные значения ПрО сравнимы со значениями для иммуноанализа с электрофоретическим сбором образца на микрочипе.

Эффективность нового метода была подтверждена детекцией ТБ-специфических и воспалительных биомаркеров в образцах лёгочной жидкости, собранных из выдыхаемого больным ТБ воздуха. Данный способ позволил обнаружить IL-1 β (рис. 32Б) и оценить его количество в 0,5 фг. Дополнительным преимуществом метода является то, что одну и ту же мембрану можно использовать для последовательного анализа ряда белков, используя МЧ, покрытые антителами различной специфичности. Так как нековалентные связи антиген-антитело разрушаются при нагрузке 35-240 пН, а для типичной ковалентной связи значение прочности

превышает 1 нН, при отрыве частицы от поверхности гидродинамической силой разрывается именно межмолекулярная, а не ковалентная связь между мембраной и анализом. Это означает, что после удаления с поверхности одного сорта МЧ на ней можно связать следующий. Для демонстрации такой возможности был проведен анализ сначала на общий, а затем на Pstsl-специфический IgA (анализ типа «far-western blot»). При этом Pstsl-специфичные иммуноглобулины были обнаружены в образце, взятом у больного туберкулёзом, и не обнаружены в образце участника контрольной группы, не имеющего выраженных симптомов (рис. 32Г). Таким образом, полученный результат создаёт основу для неинвазивной диагностики лёгочных заболеваний по следовым количествам белковых биомаркеров в выдыхаемом воздухе. Наконец, надо отметить еще одно достоинство метода - чрезвычайно низкий расход антител: для одного анализа требуется всего 3 нг. Для сравнения, типичный расход антител в Вестерн-блоте составляет ~1 мкг.

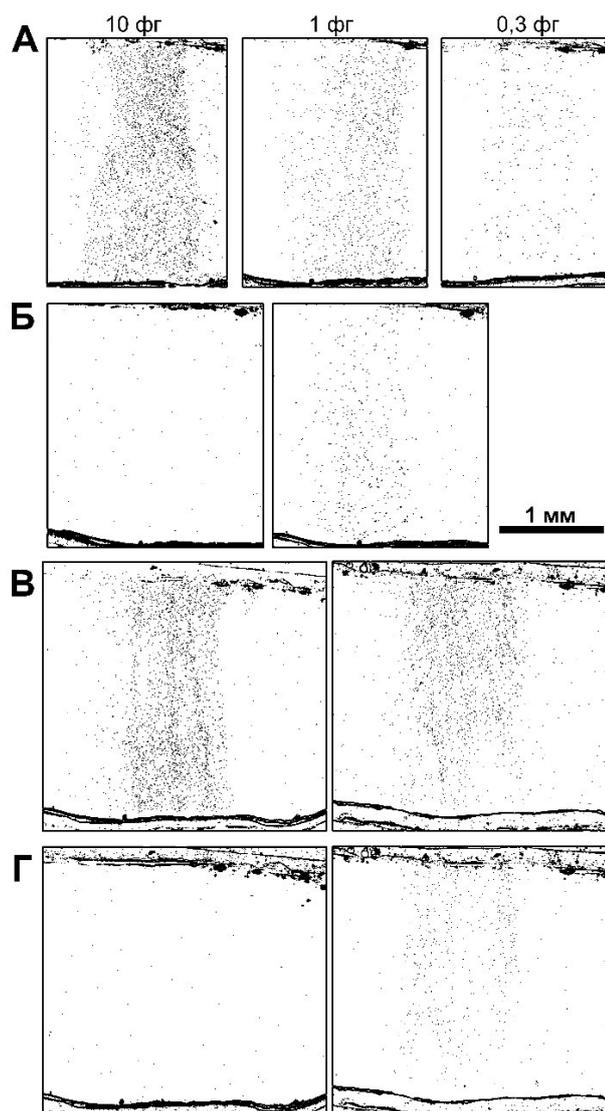


Рис. 32. Иммуноблоттинг образцов выдыхаемого воздуха с детекцией магнитными метками (отрицательный контраст). (А) Анализ на IL-1 β образца, полученного от человека, с добавлением указанных количеств IL-1 β ; (Б) анализ на IL-1 β образцов, полученных от участника контрольной группы (слева) и больного туберкулёзом (справа); (В) анализ на общий IgA образцов, полученных от участника контрольной группы (слева) и больного туберкулёзом (справа); (Г) те же белковые полосы, что и на панели В, проанализированы на Pstsl-специфический IgA.

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 наночипов с калиброванными порами удалось проанализировать образцы выдыхаемого воздуха больных туберкулезом 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 иммуоблоттинга. 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%. Продemonстрировано применение метода для неинвазивной диагностики туберкулеза лёгких по выдыхаемому воздуху, собранному на нейлоновых наночипах 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 минут. Высокая специфичность продемонстрирована определением биотоксинов в образцах сложного состава, таких как молоко и мясо.
3. В результате систематических исследований разработана методология проведения ультрачувствительного высокоспецифичного гибридационного анализа фрагментов ДНК на микрочипах на основе целлюлозной мембраны с пределом обнаружения 0,1 фМ и временем анализа до 5 минут. 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 минут 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 минут. Аналитические возможности метода продемонстрированы определением туберкулёз-специфического иммуноглобулина А и интерлейкина-1 β в собранных на нанофильтрах образцах выдыхаемого воздуха больных туберкулёзом легких.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

Статьи в журналах 1-го квартала

1. **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). (Объём 0,5 п.л., вклад 80%).
2. **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). (Объём – 0,2 п.л., вклад 80%).
3. **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). (Объём 0,4 п.л., вклад 80%).

4. **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). (Объём 0,3 п.л., вклад 80%).
5. **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). (Объём 0,4 п.л., вклад 80%).
6. **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(14). P. 7295-7301 (IF 6.643). (Объём 0,4 п.л., вклад 80%).
7. 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). (Объём 0,4 п.л., вклад 30%).
8. **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). (Объём 0,4 п.л., вклад 80%).
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). (Объём 0,4 п.л., вклад 30%).
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). (Объём 0,7 п.л., вклад 20%).
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). (Объём 0,4 п.л., вклад 70%).
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). (Объём 0,4 п.л., вклад 70%).

Статьи в журналах 2-го квартала

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. (Объём 0,7 п.л., вклад 70%). [**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)].
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. (Объём 0,7 п.л., вклад 70%). [**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).]
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). (Объём 0,8 п.л., вклад 60%).

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). (Объём 0,7 п.л., вклад 50%).

Статья в журнале 3-го квартала

17. **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. (Объём 0,2 п.л., вклад 80%). [**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. (Объём 0,2 п.л., вклад 70%).

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 № 2741245 от 21.01.2021. (Объём 0,2 п.л., вклад 70%).

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. (Объём 0,2 п.л., вклад 80%).

Список сокращений: БСА – бычий сывороточный альбумин, h-IgA – иммуноглобулин А человека, h-IgG – иммуноглобулин G человека, ДИ – доверительный интервал, ДЛФО – теория Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека, EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, IL-1 β P – интерлейкин-1 β , m-IgA – иммуноглобулин А мыши, LT, SEA, SEB, TSST – энтеротоксины, *M. tuberculosis* – *Mycobacterium tuberculosis*, МЧ – магнитные частицы, NHS – N-гидроксисукцинимид, Ова – овальбумин, ПрО – предел обнаружения, CDR - процедура циклического «стекания-восполнения», СО – стандартное отклонение, СТ – холерный токсин, SA – стрептавидин, ТБ – туберкулёз, ТСЕР – трис-(2-карбоксиил) фосфин, ФИТЦ – флуоресцеин-изотиоцианат, ЭП – электропрядение, ЭР – электрораспыление.

xxx

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.