

## ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ

### УСИЛЕНИЕ СИГНАЛА SPR БИОСЕНСОРА С ПОМОЩЬЮ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ПРИМЕРЕ АНАЛИЗА БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Ю.В. Мезенцев, О.В. Гнеденко, П.В. Ершов\*, А.С. Иванов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул. 10; \*эл. почта: pavel79@inbox.ru

Описан высокочувствительный метод детекции низких концентраций целевых белков с помощью усиления сигнала оптического биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием золотых наночастиц (по типу “сэндвич”). В качестве модели биомаркера использован коммерческий белковый препарат бета-2-микроглобулина (B2M), а также препараты поликлональных (Pab) и моноклональных антител (Mab) к B2M. Данный метод анализа вследствие его универсальности и воспроизводимости может быть применён для анализа любых белковых биомаркеров. Подробно рассмотрены экспериментальные протоколы синтеза золотых наночастиц (GNP), получения их конъюгатов с поликлональными антителами (Pab/GNP), спектрофотометрического определения концентрации наночастиц и конъюгатов, ковалентной иммобилизации Mab на поверхности оптического чипа CM5 биосенсора, регистрации взаимодействий Mab-биомаркер и формирования типа “сэндвич” Mab-биомаркер-Pab и Mab-биомаркер-Pab/GNP.

**Ключевые слова:** поверхностный плазмонный резонанс; оптический биосенсор; усиление сигнала; золотые наночастицы; белок-белковые взаимодействия

DOI: 10.18097/BMCRM00053

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время появляются и быстро развиваются новые сенсорные технологии детекции различных биомаркеров для диагностических целей. Одной из наиболее перспективных является технология поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [1]. Биосенсоры на эффекте SPR обладают рядом существенных преимуществ, такими как универсальность принципа анализа любых аналитов, линейный динамический диапазон анализа, более высокая точность и воспроизводимость по сравнению с ИФА (коэффициент вариации определения концентрации целевого белка в сыворотке крови <1.5% в одной серии и <3% в разных сериях) и высокая степень автоматизации. Однако существующая общая для всех методов регистрации проблема ограничения достоверного обнаружения низких концентраций биомаркера в сыворотке крови при прямой регистрации его взаимодействия со специфическим моноклональным антителом (>1 нМ) актуальна и для SPR биосенсоров. В то же время содержание важных для биомедицины биомаркеров в плазме крови, как правило, на порядки ниже (0.1-100 пМ). Поэтому повышение чувствительности SPR биосенсоров для разработки новых методов диагностики на сегодня является одной из актуальных задач.

Известны различные подходы для усиления SPR сигнала: золотые наночастицы [2], “сэндвич”-схема с двумя антителами [3-5], самоформирующиеся монослои и “сэндвич”-схема [6, 7], латексные частицы [8], сопряжённая ферментативная реакция преципитации [9]. Применение наночастиц для усиления сигнала оптического SPR биосенсора представляется особенно перспективным подходом, так как величина сигнала биосенсора прямо пропорциональна массе аналита, взаимодействующего с иммобилизованным на поверхности оптического чипа лигандом. Поэтому утяжеление молекул аналита путём их селективной конъюгации с наночастицами может значительно (на порядки) усилить сигнал и, соответственно, понизить детектируемый порог концентраций биомаркера. Целью данной работы являлось описание протокола детекции белков в низкой концентрации на базе оптического SPR биосенсора с использованием золотых наночастиц.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

##### Реактивы и препараты белков

Следующие растворы и реагенты были получены от “GE Healthcare” (США): (1) HBS-EP+ буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0.005% детергента P20, 10 мМ HEPES, pH 7.4); (2) 10 мМ ацетатный буфер, pH 5.0; (3) 10 мМ глицин-HCl (pH 2.5); (4) набор реагентов для ковалентной иммобилизации лигандов за аминогруппы: EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодииимид гидрохлорид), NHS (N-гидроксисукцинимид), 1 М этаноламин-HCl (pH 8.5); (5) бета-2-микроглобулин человека (B2M); (6) поликлональные антитела кролика (Pab) к B2M; (7) моноклональные антитела мыши (Mab) к B2M. Бычий сывороточный альбумин (BSA) был получен от “Calbiochem” (США).

Реактивы для синтеза золотых наночастиц были получены от “Sigma Aldrich” (США): (1) тетрахлораурат водорода ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ); (2) цитрат натрия ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{OH}(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); (3) боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ).

Другие реактивы и препараты аналитической чистоты были получены от отечественных поставщиков.

##### Протокол синтеза золотых наночастиц (GNP) [10]

1. Приготовить 50 мл водного раствора, содержащего 0.1 мМ  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и 0.15 мМ  $\text{C}_3\text{H}_4\text{OH}(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (цитрат натрия).
2. Приготовить 0.5 мл раствора 0.05 М  $\text{NaBH}_4$ .
3. При постоянном перемешивании прилить по каплям 0.5 мл свежеприготовленного раствора 0.05 М  $\text{NaBH}_4$ .
4. Хранить полученную суспензию золотых наночастиц в темноте при температуре 4°C.

##### Протокол получения конъюгатов поликлональных антител (Pab) с золотыми наночастицами (Pab/GNP)

1. Приготовить 100 мкл раствора Pab (50 мкг/мл) в 5 мМ фосфатном буфере (pH 7.5).
2. Добавить к приготовленному раствору Pab 900 мкл суспензии золотых наночастиц.



3. Инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин.
4. Добавить 100 мкл раствора БСА (10%) в 50 мМ фосфатном буфере (pH 9.0).
5. Инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин.
6. Центрифугировать при скорости 16100 g и температуре 4°C в течение 60 мин.
7. Отобразить супернатант.
8. Оставшийся осадок ресуспензировать в 99 мкл HBS-EP+ буфера.
9. Для длительного хранения добавить 0.02%  $\text{NaN}_3$  для подавления бактериального роста.
10. Хранить полученные конъюгаты Pab/GNP в темноте при температуре 4°C.

#### Определение концентрации золотых наночастиц, конъюгированных с Pab

Концентрация золотых наночастиц в суспензии была определена на спектрофотометре NanoDrop 1000 ("Thermo Scientific", США) при длине волны 520 нм.

#### Ковалентная иммобилизация моноклональных антител мыши (Mab) к B2M на поверхности оптического чипа

Иммобилизация Mab и регистрация белок-белковых взаимодействий были выполнены на оптическом биосенсоре Biacore 3000 ("GE Healthcare", США) с использованием чипа CM5, покрытого карбоксиметилированным декстраном. Mab иммобилизовали согласно стандартному протоколу иммобилизации за аминогруппы белка [11].

#### Протокол иммобилизации Mab

1. Приготовление смеси растворов 100 мМ NHS и 400 мМ EDC (1:1).
2. Инъекция приготовленной смеси растворов NHS/EDC в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин.
3. Приготовление раствора Mab в концентрации 50 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5.0).
4. Инъекция раствора Mab в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин.
5. Инъекция раствора 1 М этаноламина (pH 8.5) в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

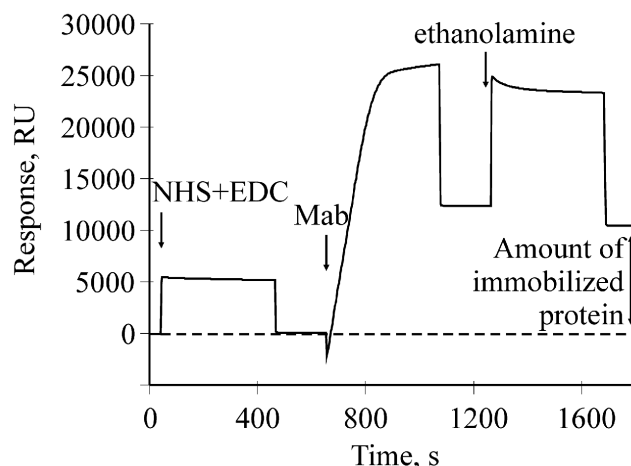
В таблице 1 в качестве примера представлен пошаговый протокол работы оптического биосенсора Biacore 3000 при выполнении процедуры иммобилизации Mab. В данном протоколе отражены все начальные установки биосенсора и последующие их изменения, а также все выполняемые операции.

На рисунке 1 представлена соответствующая сенсограмма иммобилизации Mab. Стрелками указаны моменты начала инъекций растворов в соответствии с протоколом. Инъекция смеси NHS/EDC активизирует карбоксильные группы на поверхности чипа.

При инъекции раствора Mab происходит иммобилизация антител на поверхности чипа путём формирования амидных связей между аминогруппами белка и карбоксильными группами карбоксиметилированного декстрана. Не вступившие в реакцию активные группы на поверхности чипа инактивируются раствором этаноламина. В результате выполнения данного протокола количество иммобилизованного белка составило 10486 RU (резонансные единицы), а 1 RU соответствует связыванию примерно 1 пг белка на 1 мм<sup>2</sup> поверхности оптического чипа.

**Таблица 1.** Пошаговый протокол работы оптического биосенсора при выполнении процедуры иммобилизации Mab к B2M

Time, s	Info
0	Timestamp: 14-May-18 10:51:05
0	Set Temperature: 25.0°C
0	Temperature: 25.0°C
0	Detection Mode: Single
0	Rack 1 (Left): THERMO_C
0	Rack 2 (Right): THERMO_A
0	Rack R (Reagent): Reag_A
0	Flow Cell: 2
0	Flow: 10 µl/min
0	Data Collection: 1 Hz
616.3	Start QUICKINJECT
649.1	Inject: Start Fc 2 R2A1
1068.8	Inject: Ready 70 µl
1103.5	End QUICKINJECT
1164.5	Start QUICKINJECT
1197.3	Inject: Start Fc 2 R2A1
1616.9	Inject: Ready 70 µl
1652.2	End QUICKINJECT
1723.4	Start QUICKINJECT
1756.2	Inject: Start Fc 2 R2A1
2175.9	Inject: Ready 70 µl
2210.4	End QUICKINJECT
2336.5	Temperature: 25.0°C



**Рисунок 1.** Сенсограмма ковалентной иммобилизации Mab к B2M за аминогруппы белка на поверхности оптического чипа CM5.

#### Регистрация белок-белковых взаимодействий

Пошаговый протокол всех выполненных операций и установок биосенсора для регистрации белок-белковых взаимодействий представлен в таблице 2.

Оптический биосенсор был термостатирован при 25°C, а в качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+ буфер. Все инъекции растворов выполнялись в режиме QuickInject при скорости потока 10 мкл/мин. Взаимодействие B2M (100 пМ) с иммобилизованными на чипе Mab регистрировалось в течение 5 мин. Последующее усиление сигнала по "сэндвич"-схеме при инъекции Pab или конъюгата Pab/GNP регистрировалось в течение 3 мин. Регенерация поверхности чипа выполнялась при инъекции 10 мМ глицин-HCl (pH 2.5) в течение 30 с при скорости потока 10 мкл/мин. Канал биосенсора без иммобилизованного белка использовался в качестве контрольного для коррекции эффектов неспецифической сорбции белкового материала на поверхности чипа путём вычитания сигнала контрольного канала из сигнала рабочего канала.

**Таблица 2.** Пошаговый протокол работы оптического биосенсора при выполнении регистрации белок-белковых взаимодействий

Time, s	Info
0	Timestamp: 14-May-18 14:00:24
0	Set Temperature: 25.0°C
0	Temperature: 24.99°C
0	Detection Mode: 1.2
0	Rack 1 (Left): THERMO_C
0	Rack 2 (Right): THERMO_A
0	Rack R (Reagent): Reag_A
0	Flow Cell: 1-2
0	Flow: 10 µl/min
0	Data Collection: 1 Hz
939.4	Transfer: Start 450 µl B->R2A1
1023.5	Transfer: Ready
1587.0	Start QUICKINJECT
1619.9	Inject: Start Fc 1-2 R2A1
1919.7	Inject: Ready 50 µl
1955.6	End QUICKINJECT
2147.1	Transfer: Start 450 µl B->R2A2
2231.2	Transfer: Ready
2690.9	Start QUICKINJECT
2721.1	Flowfill: Start
2729.1	Flowfill: Ready
2761.3	Inject: Start Fc 1-2 R2A1
2790.8	Inject: Ready 5 µl
2824.1	End QUICKINJECT
2938.4	Start QUICKINJECT
2971.7	Inject: Start Fc 1-2 R2B1
3271.6	Inject: Ready 50 µl
3307.4	End QUICKINJECT
3347.0	Start QUICKINJECT
3380.0	Inject: Start Fc 1-2 R2C1
3559.6	Inject: Ready 30 µl
3594.4	End QUICKINJECT
3624.6	Start QUICKINJECT
3655.7	Inject: Start Fc 1-2 R2A1
3685.2	Inject: Ready 5 µl
3718.1	End QUICKINJECT
4149.3	Transfer: Start 450 µl B->R2A1
4233.6	Transfer: Ready
4382.7	Start QUICKINJECT
4416.0	Inject: Start Fc 1-2 R2B1
4715.8	Inject: Ready 50 µl
4751.4	End QUICKINJECT
4752.4	Start QUICKINJECT
4784.7	Inject: Start Fc 1-2 R2C1
4964.4	Inject: Ready 30 µl
4998.6	End QUICKINJECT
5002.5	Start QUICKINJECT
5033.5	Inject: Start Fc 1-2 R2A1
5063.0	Inject: Ready 5 µl
5095.5	End QUICKINJECT
5412.1	Start QUICKINJECT
5442.2	Flowfill: Start
5450.0	Flowfill: Ready
5482.3	Inject: Start Fc 1-2 R2A1
5511.8	Inject: Ready 5 µl
5544.7	End QUICKINJECT
6391.5	Temperature: 25.0°C

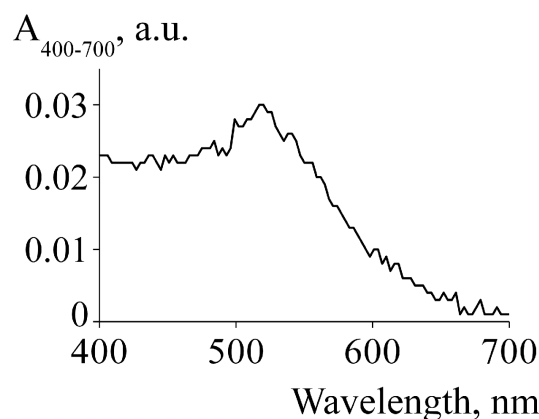
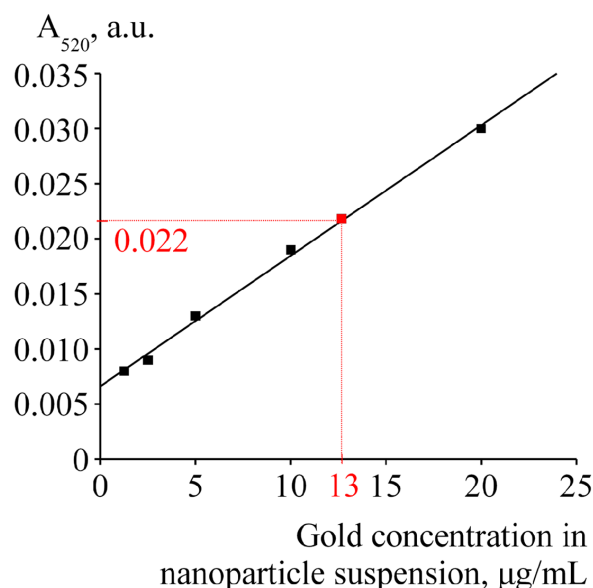
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ***Определение концентрации золотых наночастиц в суспензии*

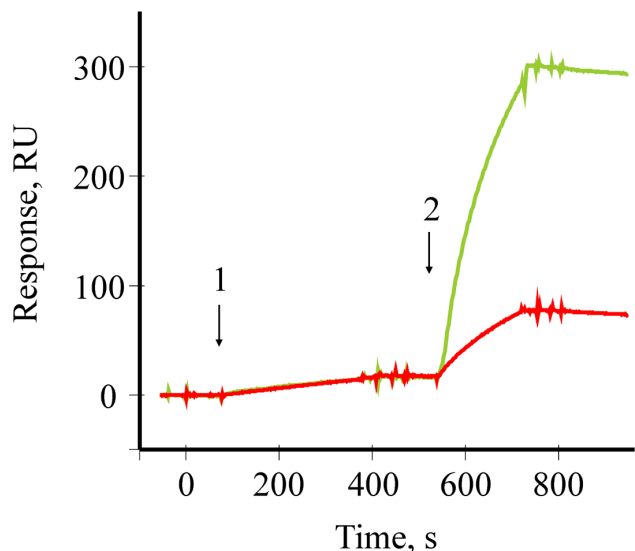
Измерение оптической плотности суспензии GNP и конъюгатов Pab/GNP было выполнено на спектрофотометре NanoDrop 1000. На рисунке 2 показан спектр поглощения образца суспензии GNP в концентрации 20 мкг/мл, из которого следует, что присутствует характерный для коллоидного золота пик поглощения при длине волны 520 нм.

На основе значений оптической плотности при 520 нм для разных концентраций золотых наночастиц (от 1 до 20 мкг/мл) был построен калибровочный график (рис. 3). По данному калибровочному графику была определена концентрация суспензии конъюгатов Pab/GNP, которая составила 65 мкг/мл. Образец для спектрофотометрирования готовили путём разведения исходной суспензии в 5 раз.

*Усиление сигнала биосенсора с помощью Pab и конъюгатов Pab/GNP*

Усиление сигнала биосенсора по “сэндвич”-схеме с помощью конъюгатов Pab/GNP осуществляли путём последовательных инъекций раствора B2M и суспензии конъюгатов Pab/GNP через канал биосенсора с иммобилизованными Mab. На рисунке 4 показаны две совмещённые сенсограммы связывания B2M (стрелка 1) с иммобилизованными на чипе Mab и усиление сигнала

**Рисунок 2.** Спектр поглощения для суспензии золотых наночастиц в концентрации 20 мкг/мл.**Рисунок 3.** Калибровочный график для разных концентраций золотых наночастиц (1.25, 2.5, 5, 10, 20 мкг/мл). Красным цветом показана точка, соответствующая суспензии наночастиц золота, конъюгированных с поликлональными антителами к B2M.



**Рисунок 4.** Сенсограммы усиления сигнала по типу “сэндвич” с помощью Pab (красная линия) и конъюгата Pab/GNP (зелёная линия) на примере анализа концентрации B2M в качестве биомаркера. Цифрами показаны моменты инъекции 100 пМ B2M (1) и Pab в свободном виде или конъюгатов Pab/GNP (2).

биосенсора по типу “сэндвич” при инъекции растворов (стрелка 2) Pab (красная сенсограмма) или конъюгатов Pab/GNP (зелёная сенсограмма). Как видно из рисунка 4, возрастание сигнала после образования тройного комплекса Mab-B2M-Pab составило 55 RU, в то время как при образовании комплекса Mab-B2M-Pab/GNP сигнал вырос до 285 RU (примерно в 5 раз).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере бета-2-микроглобулина (B2M) в качестве модели биомаркера и двух типов антител (поликлональных и моноклональных) к нему описан высокочувствительный метод детекции низких концентраций B2M с помощью усиления сигнала SPR биосенсора с использованием золотых наночастиц. Данный принцип анализа носит универсальный характер и может быть успешно применён для детекции любых белковых биомаркеров. Стоит отметить, что для анализа биомаркеров в предельно низкой концентрации требуется значительное время для их связывания с первым антителом (до 1 ч и более), и поэтому более целесообразно использовать схему анализа по принципу “обратного сэндвича”, когда конъюгат Pab/GNP добавляется в образец сыворотки крови и инкубируется в течении 1 ч. За время инкубации в пробе происходит формирование комплекса биомаркер-Pab/GNP. Затем смесь инжектируется через канал биосенсора с иммобилизованным Mab, где и происходит быстрое формирование конечного “сэндвича” Mab-биомаркер-Pab/GNP с регистрацией усиленного золотыми наночастицами SPR сигнала. Данный протокол подробно описан нами на примере анализа крайне низких концентраций кардиомиоглобина в сыворотке крови человека [5].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. SPR измерения выполнены на оборудовании ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ, поддержанном Минобрнауки РФ в рамках соглашения №14.621.21.0017 (идентификатор RFMEFI62117X0017).

## ЛИТЕРАТУРА

- Homola, J., Vaisocherová, H., Dostálek, J. & Piliarik M. (2005) Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing. *Methods*, 37(1), 26-36. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.05.003
- Hong, B. & Kang, K.A. (2006) Biocompatible, nanogold-particle fluorescence enhancer for fluorophore mediated, optical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1333-1338. DOI: 10.1016/j.bios.2005.04.007
- Liu, X., Sun, Y., Song, D., Zhang, Q., Tian, Y., Bi, S., & Zhang, H. (2004) Sensitivity-enhancement of wavelength-modulation surface plasmon resonance biosensor for human complement factor 4. *Analytical Biochemistry*, 333(1), 99-104. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.048
- Wei, J., Mu, Y., Song, D., Fang, X., Liu, X., Bu, L., Zhang, H., Zhang, G., Ding, J., Wang W., Jin, Q. & Luo, G. (2003) A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera. *Analytical Biochemistry*, 321, 209-216. DOI: 10.1016/S0003-2697(03)00407-X
- Gnedenko, O.V., Mezentssev, Y.V., Molnar, A.A., Lisitsa, A.V., Ivanov, A.S. & Archakov, A.I. (2013) Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 759, 105-109. DOI: 10.1016/j.aca.2012.10.053
- Dutra, R.F. & Kubota, L.T. (2007) An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified goldchip. *Clinica Chimica Acta*, 376, 114-120. DOI: 10.1016/j.cca.2006.07.029
- Teramura, Y. & Iwata, H. (2007) Label-free immunosensing for alpha-fetoprotein in human plasma using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 365(2), 201-207. DOI: 10.1016/j.ab.2007.03.022
- Besselink, G.A., Kooyman, R.P., van Os, P.J., Engbers, G.H. & Schasfoort, R.B. (2004) Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen. *Analytical Biochemistry*, 333(10), 165-173. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.009
- Kim, M.G., Shin, Y.B. & Jung, J.M. (2005) Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray. *Journal of Immunological Methods*, 297(1-2), 125-132. DOI: 10.1016/j.jim.2004.12.007
- Wang, M., Wang, L., Wang, G, Ji, X., Bai, Y., Li, T., Gong, S. & Li, J. (2004) Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 575-582. DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00252-5
- Biacore Sensor Surface Handbook GE Healthcare BR-1005-71 Edition AB 05/2008. P. 39-41.

Поступила: 12. 07. 2018.  
Принята к публикации: 31. 10. 2018.

## SIGNAL ENHANCEMENT OF SPR BIOSENSOR DETECTION BY USING OF GOLD NANOPARTICLES FOR HUMAN BETA-2-MICROGLOBULIN AS A MODEL PROTEIN BIOMARKER

*Y.V. Mezentsev, O.V. Gnedenko, P.V. Ershov\*, A.S. Ivanov*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: pavel79@inbox.ru

The highly sensitive method of surface plasmon resonance (SPR) detection of low concentrations of target proteins based on the biosensor signal enhancement by using gold nanoparticles (similar to “sandwich” assay type) is described. The commercial protein preparations of beta-2-microglobulin (B2M) as a model biomarker and polyclonal (Pab) and monoclonal antibodies (Mab) to B2M were used. It has been shown that this universal and reproducible method can be applied for SPR analysis of other protein biomarkers by analogy with the biomarker protein B2M. The present work is also focused on the experimental protocol description. The protocols of gold nanoparticles (GNP) synthesis, obtaining the conjugates of Pab/GNP and measuring their concentration, the protocol of Mab covalent immobilization on the optical chip CM5 of a biosensor and also SPR registration of molecular interactions Mab-biomarker and in the “sandwich” assay type Mab-biomarker-Pab or Mab-biomarker-Pab/GNP are considered in detail.

**Key words:** surface plasmon resonance (SPR); optical biosensor; signal enhancement; gold nanoparticles; protein-protein interactions

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed within the framework of the Fundamental Research Program of State Academies of Sciences for 2013-2020. SPR measurements were performed in the “Human Proteome” Core Facility of the Institute of Biomedical Chemistry (Russia, Moscow) which is supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation (unique project ID RFMEFI62117X0017).