

ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫЙ ИММУНОСЕНСОР НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ПРЯМОГО И ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА А

Фарафонова О. В.¹, Шихалиев Х. С.², Ермолаева Т. Н.¹

¹ФГБОУ ВПО «Липецкий государственный технический университет», Липецк, Россия, 398006, г. Липецк, Московская, 30, e-mail ermolaeva@stu.lipetsk.ru

²ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Разработан пьезокварцевый иммуносенсор для прямого определения следовых концентраций стафилококкового энтеротоксина А (SEA). Методами атомной силовой микроскопии и пьезокварцевого микровзвешивания изучены условия иммобилизации антител к SEA на подложку на основе самоорганизующихся монослоев ациклических и гетероциклических тиолов. Установлено, что максимальная концентрация активных сайтов распознавания антител на поверхности наблюдается на подложках из 11-меркапто-1-ундеканола и смеси 11-меркапто-1-ундеканола и 2-амино-5-меркапто-1,3,4 – триазола. Показано, что использование наночастиц золота диаметром 8 нм приводит к 2–3-кратному снижению предела обнаружения SEA с помощью пьезокварцевого иммуносенсора.

Ключевые слова: пьезокварцевый иммуносенсор, самоорганизующиеся монослои, алкилтиолы, стафилококковый энтеротоксин А, антитела, наночастицы золота.

PIEZOQUARTZ IMMUNOSENSOR BASED ON NANOPARTICLES OF GOLD FOR THE DIRECT AND RAPID DETERMINATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A

Farafonova O. V.¹, Shikhaliev H. S.², Ermolaeva T. N.¹

¹FGBOU VPO "Lipetsk State Technical University", Lipetsk, Russia, 398006, Lipetsk, Moscovskaya, 30, e-mail ermolaeva@stu.lipetsk.ru

²FGBOU VPO "Voronezh State University", Voronezh, Russia

Developed a piezoelectric immunosensor for the direct determination of trace concentrations of staphylococcal enterotoxin A (SEA). Using atomic force microscopy and quartz crystal microbalance study conditions immobilization of antibodies to SEA on a substrate based on self-assembled monolayers of acyclic and heterocyclic thiols Found that the maximum concentration of active sites on the surface of antibody present was achieved on substrates based on 11-mercapto-1-undecanol and 11-mercaptoundecanol mixture and 2-amino-5-mercapto-1, 3,4 – triazole. It is shown that the use of gold nanoparticles with a diameter of 8 nm of the analysis leads to 2–3 - fold reduction in the detection limit of SEA using piezoelectric immunosensor.

Keywords: piezoquartz immunosensor, self-assembled monolayer, alkylthiol, Staphylococcal Enterotoxin A; antibodies, gold nanoparticles.

Введение

Особенно опасные пищевые отравления наблюдаются при употреблении в пищу продуктов, загрязненных бактериальными болезнетворными микроорганизмами, в частности *Staphylococcus aureus*, продуцирующим стафилококковые энтеротоксины. К самым распространенным пищевым токсикантам относится стафилококковый энтеротоксин А (SEA), содержание которого в пищевых продуктах не должно превышать 100 нг [1, 4, 9].

Определение SEA в пищевых продуктах представляет сложную аналитическую задачу, поскольку необходимо осуществлять детектирование низких концентраций токсина в присутствии больших количеств белковых соединений, которые могут существенно искажать результаты определения. Для селективного определения SEA разработаны иммунохимические методы на основе гетерогенного иммуноферментного анализа (ELISA),

использование которых требует значительных затрат времени (2–3 час). Повысить производительность анализа позволяет применение иммунохимических сенсоров, основанных на явлении поверхностного плазмонного резонанса, и пьезокварцевых гравиметрических сенсоров [2, 5].

Пьезокварцевые иммуносенсоры являются удобным инструментом для выявления и определения низких концентраций токсикантов в сложных по составу пробах. Селективное прямое определение SEA с помощью пьезокварцевого иммуносенсора возможно в диапазоне концентраций 0,05 – 1 мг/л [7, 8]. На чувствительность детектирования и предел обнаружения гравиметрического пьезокварцевого сенсора существенно влияют аффинность рецепторного слоя, сформированного на поверхности электрода резонатора, и масса гетерогенного иммунокомплекса антиген-антитело, для увеличения которой используются антител другого типа (сэндвич-формат анализа [8]), наночастицы металлов и полимеров [2].

Для формирования высокоаффинных рецепторных покрытий сенсора применяются, как правило, многостадийные способы, включающие модификацию электрода электрогенерированными пленками полимеров или самоорганизованными монослоями тиолов, силанов [3, 5, 6], активацию поверхности бифункциональными реагентами и закрепление антител к определяемому соединению. Характер применяемой подложки влияет на величину адгезии к поверхности металлического электрода сенсора и обеспечивает сохранение постоянной массы биослоя при длительной эксплуатации в жидкости, а природа и расположение поверхностных термальных групп способствует прочному закреплению и пространственно доступной ориентации эпитопов антител для связывания с определяемым соединением.

Цель настоящего исследования – разработка пьезокварцевого иммуносенсора на основе высокоаффинного рецепторного слоя, усиленного наночастицами золота, для чувствительного и экспрессного определения стафилококкового энтеротоксина А.

Материал и методы исследования

В работе использовали следующие реагенты: стафилококковый энтеротоксин А, моноклональные антитела к стафилококковому энтеротоксину («Sigma-Aldrich», USA), этанол (х.ч., ОАО «Метафракс», Россия), гидроксилламин, ацетон, циклогексан, п-толуолсульфонат, хлороформ, ацетонитрил (о.с.ч., «Química», Испания), гексан, фенол («Reanal», Венгрия); хлорид, гидрофосфат, тетраборат и азид натрия; хлорид, дигидрофосфат и тиоцианат калия; сульфат аммония; кислоты – серная ($\rho = 1,8305 \text{ г/см}^3$) и соляная ($\rho = 1,198 \text{ г/см}^3$) (х.ч., «Реахим», Россия).

В качестве трансдюсеров применяли серийно выпускаемые резонаторы АТ-среза с собственной частотой 10 МГц с золотыми электродами диаметром 8 мм, полученными магнетронным напылением золота («Этна», Россия).

Для получения рецепторных покрытий применяли 2-амино-3-меркаптопропионовую кислоту (АМПК), 11-меркапто-1-ундеканол (МУ); S-ацетилмеркаптоянтарный ангидрид (АМК); цистамин (ЦН), (Sigma, США), (2-окси-3-меркаптоэтил)-3-бензоилпиримидин (ОМБП), 2-N-4-меркапто-6-фенил-1,3,5-триазин (МФТ), 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазол (АМТ); кросс-реагенты - : глутаровый альдегид (ГА) («Reanal», Венгрия), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиид (ЭДК), N-гидроксисукцинимид (ГС), N,N-дициклогексилкарбодиид (ДГК); 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) – карбоксиимид мето-р-толуилсульфонат (ЦГМКТ).

Качество полученных покрытий оценивали методами пьезокварцевого микровзвешивания и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Результаты исследования и их обсуждение

Пьезокварцевый гравиметрический иммуносенсор представляет собой аналитическое устройство, чувствительным элементом которого служит пьезокварцевый резонатор с иммобилизованными на поверхности электрода антителами к определяемому соединению. В качестве аналитического сигнала сенсора служит уменьшение частоты колебаний резонатора (ΔF) при увеличении массы рецепторного слоя (Δm) за счет образования гетерогенного иммунокомплекса: $\Delta F = k \cdot \Delta m$.

Рецепторный слой сенсора должен иметь хорошую адгезию к поверхности металлического электрода, высокую поверхностную концентрацию и равномерное расположение «сайтов» распознавания по всей площади электрода, минимальную массу и толщину.

Изучены закономерности формирования подложки на основе самоорганизованных слоев тиолов, различающихся длиной линкерной ножки, природой концевой группы, имеющие линейное (2-амино-3-меркаптопропионовая кислота, 11-меркапто-1-ундеканол ; цистамин) или гетероциклическое строение (2-окси-3-меркаптоэтил)-3-бензоилпиримидин,, 2-N-4-меркапто-6-фенил-1,3,5-триазин, 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазол. Для иммобилизации антител применяли кросс-реагенты, содержащие разные функциональные группы и длину углеродного скелета. Процесс генерирования рецепторного слоя контролировали методами атомно-силовой микроскопии (по изменению средней шероховатости поверхности R_a) и пьезокварцевого микровзвешивания, рассчитывая по изменению частоты колебаний резонатора значения Δm и концентрационной

чувствительности A ($A = \frac{\Delta f}{c_{At}}$, где c_{Am} – концентрация антител, нг/мл). Для оценки продолжительности службы рецепторного слоя сенсора использовали величину N , равную количеству циклов измерений аналитического сигнала.

При применении ациклических тиолов (2-амино-3-меркаптопропионовая кислота, 11-меркапто-1-ундеканол, цистамин), имеющих неразветвленную структуру, молекулы закрепляются на поверхности электрода сенсора за счет образования координационной связи Au-S- и ориентируются практически параллельно друг к другу с образованием плотной пленки [3], что сопровождается снижением средней шероховатости поверхности с 352 до 117–130 нм. Максимальное значение A отмечено для монослоя на основе 11-меркапто-1-ундеканола, что свидетельствует о наиболее высокой плотности эпитопов антител на поверхности сенсора (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика самоорганизованных монослоев на основе ациклических тиолов ($P = 0,95$, $n=3$)

Кросс-реагент	Ra, нм	Δm , мкг	A, Гц·мл·мкг ⁻¹	N
2-Меркаптоэтиламин				
ГА	175	22,76	327	22
ЭДК	247	29,90	215	21
11-Меркапто-1-ундеканол				
ГА	131	27,68	474	25
ЭДК	140	30,14	409	23
2-Амино-3-меркаптопропионовая кислота				
ГА	207	13,91	168	10
ЭДК	253	35,15	154	11
Цистамин				
ГА	125	10,21	460	20
ЭДК	130	11,40	451	19

Образование монослоя цистамина происходит за счет разрыва дисульфидной связи, в результате к поверхности сенсора присоединяется цепочка из двух углеродных атомов (что позволяет использовать в 2 раза более низкие концентрации реагента) и образуется более короткая линкерная ножка, чем в случае с 11-меркапто-1-ундеканолом. Следует отметить, что высокая адгезия монослоев ЦН и МУ обеспечивает многократное использование сенсора после регенерации без существенного изменения массы биослоя ($N = 20 - 25$).

Подложки на основе индивидуальных гетероциклических тиолов (ОМБП, МФТ, АМТ, АМК) имеют относительно высокую массу и меньшую устойчивость при эксплуатации в жидкости из-за размещения на поверхности электрода меньшего количества объемных молекул, что способствует образованию менее прочных поперечных связей в

монослой и приводит к увеличению его толщины слоя за счет присоединения дополнительных молекул гетероциклов через донорно-активные атомы O и N.

Поэтому такие тиосоединения были использованы в смешанных монослоях. Сравнение двух способов получения смешанных слоев, полученных путем нанесения на поверхность электрода раствора, включающего 2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазол и 11-меркапто-1-ундеканол, или поочередного дозирования линейного, а затем гетероциклического тиола, показало, что в обоих случаях пленки имеют одинаковую массу. Однако во втором способе удается получить более структурированные покрытия и, как следствие, более высокие концентрационные чувствительности при проведении гетерогенной иммунохимической реакции. Методом АСМ установлено, что в этом случае формируется высокоструктурированная поверхность с разноуровневыми терминальными группами, способствующими увеличению емкости слоя, вследствие последовательного чередования линейных и гетероциклических тиолов. Устойчивость таких слоев в жидкостях максимальна ($N = 30$).

Активация подложки с помощью кросс-реагента, с последующим закреплением антител, выявила наибольшую конформационную доступность антител для связывания с стафилококковым энтеротоксином А при использовании ЭДК и ГА.

Разработанные сенсоры позволяют проводить определение стафилококковый энтеротоксин А в прямом формате анализа в диапазоне 100–190 нг/мл; предел обнаружения составляет 93 нг/м.

Для повышения чувствительности определения стафилококкового энтеротоксина А. предложено использовать наночастицы золота.

Исследованы условия и разработана методика синтеза наночастиц золота (AuNP) в обратных микроэмульсиях. При нагревании и интенсивном перемешивании смешивали микроэмульсии вода-гексан, содержащие золотохлористоводородную кислоту и боргидрид натрия. Восстановление наночастиц золота проводили в присутствии ПАВ Тритон - ТХ-100. Образование наночастиц золота диаметром 8 нм происходило при мольном соотношении $[H_2O]/[ПАВ]$ равном 3,5. Размер коллоидных наночастиц контролировали по спектрам поглощения и методом атомно-силовой микроскопии.

При проведении анализа с использованием наночастиц к пробе, содержащей раствор стафилококкового энтеротоксина А, добавляли раствор коллоидного золота, при этом на поверхности сенсора формировался тройной комплекс энтеротоксин-антитело-AuNP с более высокой массой, что сопровождалось увеличением аналитического сигнала сенсора. При применении в анализе наночастиц золота наблюдалось снижение предела обнаружения до 28

нг/мл и расширение диапазона определяемых содержаний стафилококкового энтеротоксина А 41-205нг/мл.

Заключение

Проведенные исследования показали, что разработанный пьезокварцевый иммуносенсор на основе 11-меркапто-1-ундеканола или его смеси с 2-амино-5-меркапто-1,3,4 – триазолом позволяет проводить экспрессное определение стафилококкового энтеротоксина А на уровне 41–205 нг/мл

Список литературы

1. МУК 4.2. 2429-08.
2. Chu X. Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex / X. Chu // *Sensors and Actuators*. – 2006. – V. 114. – P.696–704.
3. DiBenedetto S. A. Molecular Self-Assembled Monolayers and Multilayers for Organic and Unconventional Inorganic Thin-Film Transistor Applications// *Adv. Mater.* – 2009. – V. 21. – P. 1407–1433.
4. Fleurot M. Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese// *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V.76. – P. 1367-1374.
5. Kim N. Highly Sensitive Biomolecule Detection on a Quartz Crystal Microbalance Using Gold Nanoparticles as Signal Amplification Probes/ N. Kim//*Analytical sciences*. – 2007. – V.23. – P. 1-12.
6. Pan Y. Expression and bioactivity analysis of Staphylococcal enterotoxin M and N/ Y.Pan, D. Ding, D. Li, Sh.Chen// *Protein Expression and Purification*. –2007. – V. 56. – P. 286-292.
7. Pekdemir M. E. Ultrasensitive and selective homogeneous sandwich immunoassay detection by Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) // *Analyst*. – 2012. – V. 137. – P. 4834.
8. Salmaina M. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 29. – P. 140–144.
9. Vasconcelos N. G. Full Length Research Paper Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods/ N. G. Vasconcelos, M. L. Ribeiro de Souza da Cunha // *J. Pub. Health Epidem.* – 2010. – V. 2(3). – P.29-42.

Рецензенты:

Дмитриенко Станислава Григорьевна, д.х.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», химический факультет, г. Москва.

Оскотская Эмма Рафаиловна, д.х.н., профессор, зав. каф. химии, ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», г. Орел.