

## Оптическая регистрация образования иммунных комплексов с использованием наночастиц коллоидного золота

© А.Н. Спицын<sup>1</sup>, Д.В. Уткин<sup>1</sup>, М.Н. Киреев<sup>1</sup>, Н.А. Шарапова<sup>1</sup>,  
П.С. Ерохин<sup>1</sup>, В.Г. Германчук<sup>1</sup>, В.И. Кочубей<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“ Роспотребнадзора,  
410005 Саратов, Россия

<sup>2</sup> Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,  
410012 Саратов, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
634050 Томск, Россия

e-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила в редакцию 10.07.2018 г.

Рассмотрена возможность определения образования иммунных комплексов с использованием антител, меченных наночастицами коллоидного золота и методов оптической спектроскопии. Проведены регистрация и анализ изменения спектральных характеристик золей золотых частиц диаметром 15, 60 и 90 nm, конъюгированных с иммуноглобулинами в присутствии антигенов возбудителей особо опасных инфекций. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанный методический подход оптической регистрации иммунных комплексов может явиться перспективным в создании иммунохимических методов идентификации возбудителей инфекционных болезней.

DOI: 10.21883/OS.2018.11.46848.199-18

### Введение

Спектроскопические методы анализа, основанные на взаимодействии атомов и молекул, входящих в состав вещества, с электромагнитным излучением, могут быть использованы в микробиологических исследованиях для определения высокомолекулярных соединений — корпускулярных антигенов микроорганизмов, содержащихся в исследуемой пробе. В настоящей работе рассмотрена возможность изучения спектров поглощения, прошедшего через клетки излучения, что позволяет получать информацию о биологических молекулах в их составе, обладающих широкими полосами поглощения.

Известно, что для индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней наряду с молекулярно-генетическими и бактериологическими методами применяются иммунологические методы диагностики, основанные на реакции взаимодействия специфических антител с антигенами микроорганизмов и выявлении образовавшихся иммунных комплексов [1]. Для оптической и визуальной регистрации специфической иммунологической реакции традиционно применяют антитела с ферментными, флуоресцентными метками или иммобилизованные на различных видах носителей (эритроцитарных, латексных) [2,3]. Измеряется интенсивность сигнала свечения меченых молекул. Однако, несмотря на высокую чувствительность и доступность флуоресцентных меток, такой способ регистрации является фотохимически нестабильным, квантовый выход зависит от окружающей среды и требует наличия дорогостоящих детекторов [4]. В настоящее время представляет интерес использование различных видов наноматериалов для выявления антиге-

нов микроорганизмов, характеризующиеся высокой стабильностью и устойчивостью к воздействию различных факторов, изменяющих свои оптические свойства при образовании иммунных комплексов [5]. Так, сферические наночастицы металлов могут применяться в качестве частиц-меток.

Металлические наночастицы обладают свойством поверхностного плазмонного резонанса, когда под действием переменного электрического поля возникают коллективные колебания электронов проводимости [6,7].

Метод иммуноанализа с использованием частиц коллоидного золота (КЗ) является перспективным направлением исследований, в связи с зависимостью спектральных характеристик золей от размеров наночастиц и их конъюгатов с биополимерами. Этот метод основан на свойстве биомолекул, адсорбированных на поверхности металлических наночастиц, сохранять способность вступать в возникающие биоспецифические реакции [8,9]. В отличие от иммуноферментного анализа, при использовании наночастиц КЗ, которые не являются токсичными, отсутствует необходимость дополнительного этапа инкубации с антивидовыми конъюгатами и субстратного проявления комплексов антител с антигеном, отсутствует использование канцерогенных веществ в составе субстрата (ABTS, О-дианизидин). Использование золотых наночастиц в качестве частиц-меток позволило упростить и ускорить методы регистрации эффектов специфического связывания в аналитических системах [10–13]. Белковые молекулы, конъюгированные на наночастицах, вступая во взаимодействие с биоспецифическими парами (реакция антиген-антитело) формируют вторичную биополимерную оболочку, образование которой приво-

дит к изменению физико-химических свойств золя с последующим изменением цвета [14]. Чувствительность метода регистрации с использованием металлических наночастиц в 60 раз превышает чувствительность применения флуоресцентных меток.

В представленной работе проведена оценка возможности применения антител, меченных КЗ, для оптической регистрации образования иммунных комплексов, а также оптимизация способов выявления специфической реакции и определение критериев дифференциации специфических изменений в результате агрегации и седиментации частиц.

## Получение наночастиц КЗ разного диаметра

Коллоидные растворы металлов могут быть получены различными физико-химическими методами. В наших исследованиях КЗ получали восстановлением золото-хлористоводородной кислоты (ЗХВК) цитратом натрия. Метод, предложенный Френсом [15], позволяет получать достаточно стабильные и гомодисперсные золи золота, разные по размеру диаметра частиц от 15 до 90 nm. Для получения стабильных наночастиц золота определенного размера использовали разные концентрации цитрата натрия.

Приготовление золя золота со средним размером частиц 15–17 nm осуществляли следующим образом. В колбу наливали 49.16 ml деионизованной воды, доводили до кипения с обратным холодильником на магнитной мешалке с электроподогревом, далее добавляли 0.5 ml 1% ЗХВК и увеличивали обороты мешалки, затем добавляли 1.56 ml 1%-ного раствора цитрата натрия, продолжали кипятить в течение 20 min. Получали раствор красного цвета.

Далее получали КЗ с частицами, имеющими средний диаметр 60 и 90 nm. Суть метода, как было описано выше, заключалась в следующем: к кипящему 1%-ному водному раствору ЗХВК добавляли раствор цитрата натрия в различных концентрациях, изменяемых в зависимости от требуемого размера частиц. Для получения золя золота со средними размерами частиц 60 и 90 nm использовали меньшие количества раствора цитрата натрия (0.34 и 0.22 ml соответственно) для восстановления ЗХВК.

## Отработка условий конструирования конъюгатов наночастиц золота с противочумными иммуноглобулинами

В качестве иммунореагентов для конъюгации с наночастицами КЗ различного диаметра использовали лошадиную противочумную сыворотку.

Оптимальные для стабилизации золотых наночастиц условия обычно достигаются при возможно более низ-

кой ионной силе раствора зонда и значениях pH на 0.5 единиц выше изоэлектрической точки стабилизирующего вещества. Для достижения таких условий pH золя золота доводили до 9.0 добавлением 0.2 M раствора карбоната калия. Минимальное защитное количество стабилизирующего вещества мы определяли в иммунологических планшетах с лунками объемом 200  $\mu$ l. В тех лунках, где условия среды не были оптимальными по „золотому числу“, происходила агрегация частиц золя после добавления к нему 20  $\mu$ l 10%-ного раствора хлористого натрия. Агрегация сопровождалась изменением цвета золя с красного на голубой или серый.

После определения минимального количества сыворотки способной полностью стабилизировать золь золотых наночастиц, проводили конъюгацию, причем сыворотку брали в избытке, в объеме примерно на 20% больше определенного в тесте „золотое число“.

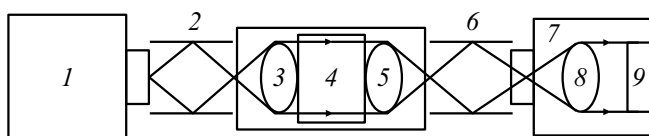
При перемешивании на магнитной мешалке к необходимому количеству иммунореагента добавляли раствор КЗ с оптимальным значением pH. Процесс конъюгации длится 15 min. Затем к конъюгату, продолжая перемешивание, добавляли вторичный стабилизатор, 0.5%-ный раствор полиэтиленгликоля ПЭГ-20000 до конечной концентрации 0.02% и перемешивали в течение 15 min. Полученный диагностикум выдерживали при температуре  $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$  не менее 1 h.

Определение формы и размеров КЗ и их конъюгатов проводили на сканирующем зондовом микроскопе (СЗМ) Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) с использованием кремниевых кантилеверов NSG01 (NT-MDT, Россия), напыленных золотом (резонансная частота кантилевера составляла 120 kHz, константа жесткости — 5.5 N/m). Исследования выполняли в режиме прерывистого контакта следующими методами: полуконтактным, рассогласования. Образцы препарировали путем нанесения на покровное стекло 4  $\mu$ l суспензии частиц КЗ с дальнейшим высушиванием при комнатной температуре.

## Экспериментальные измерения

Проведение спектрофотометрического анализа и регистрация спектральных характеристик золей золотых частиц, конъюгированных с иммуноглобулинами в присутствии антигенов возбудителей особо опасных инфекций, осуществлялось с использованием оптической схемы, представленной на рис. 1.

Разработанная оптическая конфигурация включает источник излучения AvaLight-HAL (Avantes, Нидерланды) со спектральным диапазоном длин волн от 360 до 1700 nm, имеющий разъем SMA 905, оборудованный настраиваемым фокусированием. Свет от источника излучения поступает через входной оптоволоконный кабель (световод) P400-025-SR (Ocean Optics, США) в пластиковую спектрофотометрическую кювету с длиной оптического пути 10 nm (Eppendorf, Германия), установленную в держателе кювет CUV-UV/VIS (Avantes,



**Рис. 1.** Оптическая схема проведения спектрофотометрического анализа. 1 — источник излучения, 2, 6 — оптоволоконные кабели, 3, 5 — коллимирующие линзы держателя кювет, 4 — кювета, 7 — спектроанализатор, 8 — коллимирующее зеркало спектрометра, 9 — ПЗС-детектор.

Нидерланды), во входных отверстиях которого расположены коллимирующие линзы. Прошедший через образец свет передается по выходному световоду в спектрометр HR4000 (Avantes, Нидерланды) со спектральным диапазоном от 200 до 1100 nm, соединенный с компьютером [16].

В качестве образца сравнения использовался физиологический раствор, что позволило частично учесть поглощение воды в УФ области спектра.

Кюветы с исследуемым материалом (конъюгатами золей золота со взвесями микроорганизмов) поочередно помещали в держатель кювет и регистрировали спектр поглощения раствора. Спектры каждой пробы сохраняли в отдельном файле.

Штаммы *Y. pestis* культивировали на агаре и бульоне Хоттингера (рН 7.2), 3%-ном кровяном агаре (рН 7.2) при температуре 28°C в течение 48 h. Штаммы *F. tularensis* культивировали на FT-агаре при температуре 37°C в течение 48 h. Агаровые культуры микроорганизмов для проведения исследований снимали петлей и суспендировали в 5 ml физиологического раствора до концентрации, соответствующей 10 единиц отраслевого стандартного образца мутности (ОСО 42-28-85П). Взвеси микроорганизмов обеззараживали в соответствии с СП 1.3.3118-13 [17].

## Результаты и их обсуждение

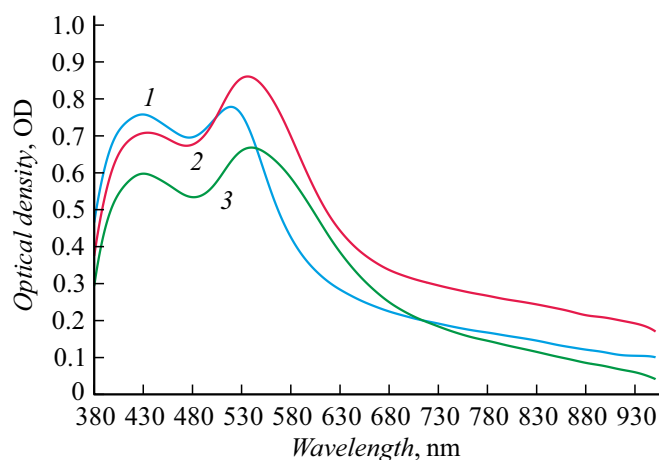
По данным СЗМ метода исследований размеры золей золотых частиц составили в среднем — 15, 60 и 90 nm. Спектры этих золей имеют пики поглощения с максимумами при длине волны  $\lambda$ , равные 518, 533 и 540 nm соответственно. Сами же металлические наночастицы имели сферическую и вытянутую (овальную) формы. Следует отметить, что конъюгация золей золота с антителами чумного микроба приводит к смещению максимума поглощения золей в длинноволновую область на 4–8 nm.

Изменение оптических свойств золотых золей обусловлено формированием полимолекулярной оболочки при адсорбции антител на поверхности частиц золота. Адсорбция белка изменяет диэлектрическую проницаемость среды вблизи поверхности наночастиц, и в регистрируемых спектрах поглощения наблюдаются различия по сравнению со спектрами исходных золей [18].

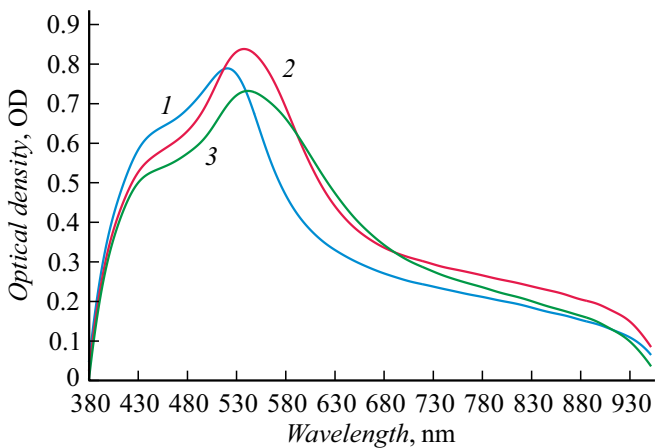
Для оценки возможности применения антител, меченных КЗ, для регистрации образования иммунных комплексов с использованием метода спектрофотометрии исследованы изменения оптических свойств конъюгатов золей с чумными иммуноглобулинами при адсорбции гомологичных антигенов *Yersinia pestis*. Так, при добавлении взвеси чумного микроба в концентрации  $5 \cdot 10^8$  CFU/ml к раствору биоконъюгата образуется спектр поглощения, представляющий собой сумму спектров поглощения *Y. pestis* и биоконъюгата (рис. 2), обладающего двумя максимумами. Первый пик расположен в области 380–430 nm, который характерен для микробных клеток, а второй пик вблизи максимума поглощения КЗ 520–540 nm. Для конъюгата антител с золотыми наночастицами размерами 15, 60 и 90 nm при добавлении взвеси чумного микроба до начала инкубации максимум поглощения наблюдался при длинах волн 519, 536 и 540 nm соответственно.

После инкубирования смеси в течение 30 min при температуре 37°C наблюдается уменьшение амплитуды коротковолновой полосы поглощения в среднем на 20% по сравнению с моментом времени до инкубации (рис. 3). Это приводит к видимому сдвигу максимума поглощения, расположенного на 520–540 nm в длинноволновую область на 2, 2 и 4 nm для конъюгатов с золотыми наночастицами размерами 15, 60 и 90 nm соответственно. При этом его оптическая плотность увеличивается примерно на 9%.

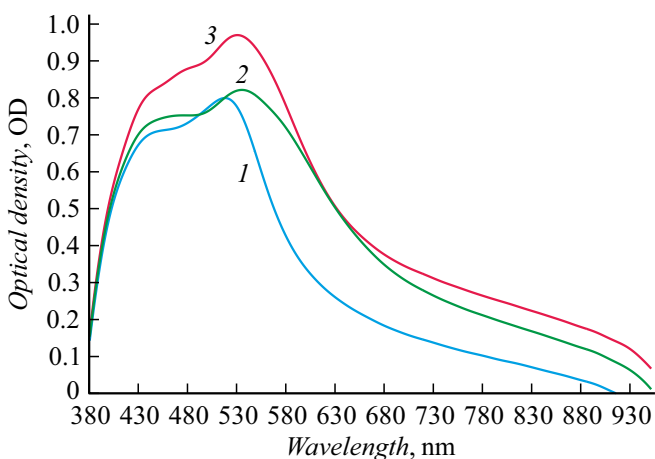
Для сравнения были изучены спектральные характеристики взаимодействия конъюгатов золей при добавлении гетерологичных антигенов взвеси *Francisella tularensis*, взятой в концентрации  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml (рис. 4). При данном неспецифическом взаимодействии отсутствует ярко выраженный пик поглощения в диапазоне 380–430 nm, наблюдаемый при образовании комплексов антиген–антитело.



**Рис. 2.** Спектры поглощения взвесей микроорганизмов *Y. pestis* с иммуноглобулинами чумными, мечеными КЗ (IgAu). 1 — IgAu (15 nm) + *Y. pestis* 0 min, 2 — IgAu (60 nm) + *Y. pestis* 0 min, 3 — IgAu (90 nm) + *Y. pestis* 0 min



**Рис. 3.** График изменений спектров поглощения взвесей микроорганизмов *Y. pestis* после инкубации с иммуноглобулинами чумными мечеными коллоидным золотом (IgAu). 1 — IgAu (15 nm) + *Y. pestis* 30 min при температуре 37°C, 2 — IgAu (60 nm) + *Y. pestis* 30 min при температуре 37°C, 3 — IgAu (90 nm) + *Y. pestis* 30 min при температуре 37°C.



**Рис. 4.** Спектры поглощения взвесей микроорганизмов *F. tularensis* с иммуноглобулинами чумными мечеными коллоидным золотом (IgAu). 1 — IgAu (15 nm) + *F. tularensis* 0 min, 2 — IgAu (60 nm) + *F. tularensis* 0 min, 3 — IgAu (90 nm) + *F. tularensis* 0 min.

После процедуры инкубации этот пик становится еще более неочевидным, а в области 500–600 nm изменения резонансной полосы не происходит (рис. 5). Происходит снижение оптической плотности среды в коротковолновой области в среднем на 9%.

Наблюдаемое снижение оптической плотности в диапазоне 360–430 nm объясняется оседанием незначительного количества клеток во время инкубации. Изменение хода кривой поглощения происходит вследствие неспецифического изменения размеров рассеивателей.

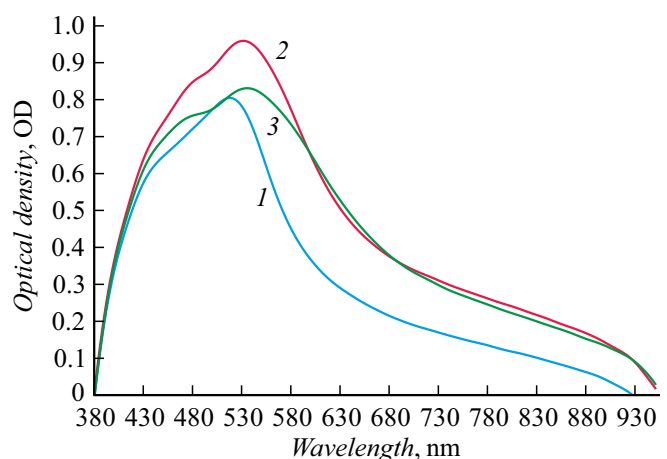
Следовательно, характерных изменений в графиках, наблюдаемых при образовании комплекса антиген-антитело с КЗ при взаимодействии туляремийного мик-

роба и противочумной сыворотки, нет, что указывает на отсутствие специфической реакции.

## Выводы

В результате проведенных исследований получены биоконъюгаты КЗ с антителами против антигенов *Yersinia pestis* и подобраны условия синтеза, обеспечивающие получение частиц золота со средним размером 15–17, 60 и 90 nm. Изучение спектров поглощения золей в видимой области электромагнитного излучения показало, что при адсорбции антител на наночастицах золота происходит смещение максимума поглощения золей в длинноволновую область на 4–8 nm. Продемонстрирована возможность регистрации специфической реакции взаимодействия антител при инкубации с гомологичными антигенами чумного микроба при помощи спектрофотометрии. В данном случае наблюдается уменьшение амплитуды коротковолновой полосы поглощения на 20%, смещение максимума поглощения, расположенного на 520–540 nm, в длинноволновую область на 2–4 nm и увеличение интенсивности поглощения на 9%. При неспецифическом взаимодействии изменений в коротковолновой области и резонансной полосы в диапазоне 500–600 nm не наблюдается, что может служить критерием отсутствия специфического взаимодействия.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что методический прием оптической регистрации образования иммунных комплексов (антиген-антитело), меченных КЗ, может явиться перспективным подходом в создании иммунохимических методов идентификации возбудителей инфекционных болезней.



**Рис. 5.** График изменений спектров поглощения взвесей микроорганизмов *F. tularensis* после инкубации с иммуноглобулинами чумными мечеными коллоидным золотом (IgAu). 1 — IgAu (15 nm) + *F. tularensis* 30 min при температуре 37°C, 2 — IgAu (60 nm) + *F. tularensis* 30 min при температуре 37°C, 3 — IgAu (90 nm) + *F. tularensis* 30 min при температуре 37°C.

## Список литературы

- [1] Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1987. 416 с.
- [2] Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство / Под ред. акад. РАН Г.Г. Онищенко, акад. РАН В.В. Кутырева. 2-е изд., переработанное и дополненное. ООО „Буква“, 2014. 284 с.
- [3] Бойко А.В., Киреев М.Н., Осина Н.А., Куклев В.Е. // Биотехнология. 2016. Т. 32. № 4. С. 49–55.
- [4] Егоров А.М., Гукасов В.М., Иванов А.И., Рубцова М.Ю., Яминский И.В. // Инноватика и экспертиза. 2014. Вып. 2 (13). С. 60–68.
- [5] Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н. // Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 3–4. С. 69–86.
- [6] Кавецкая И.В., Волошина Т.В., Караванский В.А., Красовский В.И. // Конденсированные среды и межфазные границы. 2009. Т. 11. № 1. С. 53–57.
- [7] Henglein A.J. // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. N 21. P. 5457–5471. doi 10.1021/j100123a004
- [8] Мальтанова А.М., Пыж А.Э., Ермакова Т.С., Врублевская О.Н., Воробьева Т.Н. // Вестник БГУ. Сер. 2. 2012. № 3. С. 30–34.
- [9] Brada D., Roth J. // Anal. Biochem. 1984. V. 142. N 1. P. 79–83. doi 10.1016/0003-2697(84)90518-9
- [10] Hayat M.A. // Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications. San Diego, CA: Academic Press. 1989. V. 1. doi 10.1016/C2009-0-21667-9
- [11] Schultz S., Smith D.R., Mock J.J., Shultz D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. N 3. P. 996–1001. doi 10.1073/pnas.97.3.996
- [12] Thanh N.T.K., Vernhet A., Rosenzweig Z. // Springer Ser. Chem. Sens. Biosens. 2005. V. 3. P. 261–277. doi 10.1007/3-540-27757-9\_8
- [13] Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A. // Science. 1997. V. 277. N 5329. P. 1078–1081. doi 10.1126/science.277.5329.1078
- [14] Lazarchik V.A., Vrublevskaya O.N., Vorobyova T.N. // Physics, chemistry and application of nanostructures. 2005. P. 390–393. doi 10.1142/9789812701947\_0087
- [15] Frens G. // Nature Phys. Sci. 1973. V. 241. N 1. P. 20–22. doi 10.1038/physci241020a0
- [16] Уткин Д.В., Германчук В.Г., Глазков А.Н., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Задохин С.Н., Щербаков Д.А. // Вестник СГТУ. 2013. № 4 73. С. 49–51.
- [17] Санитарно-эпидемиологические правила. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): СП 1.3.3118-13. 180 с.
- [18] Лазарчик В.А., Врублевская О.Н., Воробьева Т.Н. // Вестник БГУ. 2006. Сер. 2. № 2.