

УДК 61:577.1

©Коллектив авторов

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОАНАЛИЗ КАРДИОМИОГЛОБИНА

В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, М.Ю. Вагин, Е.В. Супрун, А.И. Арчаков*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10; тел.: 8 (499) 246-58-20; факс: 8 (499) 245-08-57; эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Разработаны методы определения миоглобина с помощью анализа электрохимических параметров модифицированных электродов. Метод прямой детекции основан на взаимодействии миоглобина сердечной мышцы человека с антителами к миоглобину с последующей электрохимической регистрацией гемопротеина. При модификации электрода мембраноподобным синтетическим поверхностно-активным дидодецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ), наночастицами золота и антителами к кардиомиоглобину сердечной мышцы человека регистрируется электрохимическое восстановление гема миоглобина при наличии в исследуемых образцах антигена (миоглобина). Реакция связывания миоглобина с антителами, иммобилизованными на поверхности электрода, была зарегистрирована также с использованием спектроскопии электрохимического импеданса. Исследование электроаналитических характеристик выявило высокую специфичность и чувствительность разработанного метода. Биосенсор характеризовался низким пределом обнаружения и широким рабочим диапазоном определяемых концентраций: от 17, 8 до 1780 нг/мл (от 1 нМ до 100 нМ). Предложен также метод определения миоглобина по сигналу наночастиц золота. Сигнал детектировали методом инверсионной вольтамперометрии. Наблюдалось изменение площади катодного пика и высоты пика восстановления оксида золота для электродов с антителами, и для электродов, содержащих комплекс антитело - миоглобин.

Ключевые слова: наночастицы золота, миоглобин, кардиомаркеры, спектроскопия электрохимического импеданса, инверсионная вольтамперометрия.

ВВЕДЕНИЕ. Ранняя диагностика сердечно-сосудистых заболеваний, занимающих первое место среди всех случаев смерти, является одним из основных факторов их успешного лечения. Открытие новых биохимических маркеров острого инфаркта миокарда (ОИМ) определило потребность в разработке точных экспрессных методов их определения, в результате чего были предложены новые биохимические лабораторные диагностики ОИМ [1-3].

К белковым маркерам ОИМ относят тропонины I и T, сердечную изоформу креатинфосфокиназы и миоглобин (МБ). В настоящее время сердечные тропонины считаются наиболее специфичными маркерами диагностики ОИМ. Однако МБ является наиболее ранним маркером ОИМ и обнаруживается уже через 1-3 часа. При повреждении сердечной мышцы МБ (молекулярная масса 17,8 кДа) быстро высвобождается в кровь, а затем выводится в неизменном виде с мочой, поэтому его концентрация зависит от функции почек. При ОИМ концентрация миоглобина резко повышается от нормы (женщины 12-76 нг/мл, мужчины 19-92 нг/мл) до 1500 нг/мл [4, 5]. По уровню миоглобина можно судить об обширности ОИМ, т.е. при инфаркте миокарда выраженность гипермиоглобинемии находится в прямой зависимости от размеров очага некроза [6, 7].

Среди методов определения МБ наиболее широко используется иммунохимический подход, реализованный в виде твёрдофазного

* - адресат для переписки

иммуноферментного анализа (ИФА) с хемилюминесцентной детекцией [8], усиления флуоресценции на пленках серебряных частиц [9-11], а также детекция МБ с помощью антител, меченных золотыми наночастицами [12]. Амперометрический иммуносенсор для детекции миоглобина в цельной крови был разработан на основе сэндвич-анализа с использованием щелочной фосфатазы в качестве ферментативной метки антител [13].

Однако методики анализа миоглобина являются достаточно сложными, длительными по времени, требующими дополнительной модификации антител, и с их помощью удается определить лишь ограниченный диапазон концентраций миоглобина. Электрохимические биосенсоры имеют ряд преимуществ по сравнению с другими сенсорными системами: быстрота определений, возможность прямой детекции определяемого компонента без введения дополнительных меток, широкий диапазон определяемых концентраций. Использование наноструктурированных электродов позволяет существенно повысить чувствительность метода. Кроме того, биоэлектрохимические подходы позволяют миниатюризировать сенсорное устройство и в перспективе, иметь прототип “laboratory-on-a-chip” устройства [14, 15]. Наночастицы металлов используются для формирования электродных покрытий, обеспечивающих благоприятное микроокружение для усиления прямого переноса электронов между редокс-активным белком и электродом [16-19].

Цель данной работы - разработка электрохимического сенсора на основе наноструктурированных электродов для определения миоглобина. Метод основан на усилении сигнала этого гемопroteина при использовании электродов, модифицированных коллоидным золотом и на возникновении каталитического тока при взаимодействии восстановленной формы миоглобина с кислородом. Специфичность анализа обеспечивается иммобилизацией на электроде антител к миоглобину.

В ходе исследования были получены одноразовые электроды, модифицированные золотыми наночастицами и антителами к миоглобину сердечной мышцы. Связывание антигена в аэробных условиях приводит к появлению вольтамперного отклика, пропорционального количеству связанного с антителами миоглобина.

МЕТОДИКА.

Реагенты. В работе были использованы миоглобин миокарда человека (“Sigma-Aldrich”, чистота 95%), миоглобин скелетных мышц кита (“Sigma”), цитохром с из сердца быка (“Merck”), моноклональные антитела к миоглобину сердца человека (“Biodesign International”), диоддецилдиметиламмоний бромид ДДАБ, HAuCl_4 и NaBH_4 (“Sigma-Aldrich”), бычий сывороточный альбумин (“CalBioChem”).

Для приготовления растворов антител, кардиомиоглобина, миоглобина скелетных мышц кита и цитохрома с использовался 0,1 М калий-фосфатный буфер, содержащий 0,05 М NaCl , pH 7,5.

Синтез коллоидного раствора золота (наночастиц золота), стабилизированного ДДАБ, проводили согласно [19]. К 1 мл 0,1 М раствора ДДАБ в хлороформе добавляли при интенсивном перемешивании 0,5 мл 10 мМ водного раствора HAuCl_4 . Далее при интенсивном перемешивании медленно добавляли 0,2 мл свежеприготовленного водного раствора 0,4 М NaBH_4 . Через 2 часа красный органический слой отделяли от воды и хранили в холодильнике при +4°C. Спектрально коллоидный раствор золота, стабилизированный ДДАБ в хлороформе, был охарактеризован $\lambda_{\text{max}} = 520$ нм [20, 21]. Концентрацию наночастиц золота (5 мМ) в 0,1 М ДДАБ в хлороформе рассчитывали в соответствии со стехиометрией реакции

Оборудование. Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB (“Eco Chemie” Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре

в 0,1 М калий–фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,5. Измерения электрохимического импеданса проводили с помощью анализатора частотного отклика Solartron 1255 (Великобритания) в разбавленном растворе фонового электролита (0,01 М KCl). Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости развёртки от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии: (SWV, восстановление, аэробные условия): начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал –600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц. Параметры, используемые при дифференциальной импульсной вольтамперометрии: (DPV) амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал –600 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП “ЭЛКОМ”, Россия, <http://www.elcom-moscow.ru> (графитовая паста для печати Achison)), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами, и хлорсеребряным внутренним электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы даны относительно хлорсеребряного электрода сравнения.

Приготовление электродов. Для модификации электродов на рабочий графитовый электрод наносили 2 мкл коллоидного раствора золота, стабилизированного ДДАБ в хлороформе (ДДАБ/Au). Затем электрод сушили в течение 30 минут на воздухе при комнатной температуре. Для последующей модификации миоглобином на рабочий электрод, предварительно модифицированный ДДАБ/Au, наносили 2 мкл раствора миоглобина нужной концентрации. Далее электрод выдерживали 12 часов при +4°C. Для модификации антителами на рабочий электрод, предварительно модифицированный ДДАБ/Au, помещали 1 мкл раствора антител (70 нг/мкл). Далее электрод сушили в течение 10 минут и выдерживали 12 часов при +4°C. Для снижения неспецифического отклика на электроды, модифицированные антителами, наносили 2 мкл блокирующего буфера (0,1 М калий–фосфатный буфер, pH 7,5, содержащий 1% бычий сывороточный альбумин и 0,05 % Твин-21). Далее электрод сушили в течение 10 минут и также выдерживали на воздухе 2 часа при комнатной температуре или 12 часов при +4°C. Затем электроды промывали 3 раза дистиллированной водой для удаления избытка антител.

Для проведения реакции связывания антигена с антителами, иммобилизованными на ДДАБ/Au электроде, на электрод наносили 2 мкл раствора миоглобина нужной концентрации (0-1750 нг/мл, 0-100 нМ). Далее электроды помещали в закрытую ёмкость и инкубировали 30 минут при 37°C. Затем электроды промывали 3 раза 0,1 М калий-фосфатным буферным раствором, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,5 для удаления несвязанных с антителами молекул миоглобина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Миоглобин (от греч. *mys* – мышца) - глобулярный белок с молекулярной массой 17,8 кДа. Молекула миоглобина состоит из одного гема и одной полипептидной цепи, содержащей 153 аминокислотных остатков. В организме человека миоглобин обеспечивает транспорт и сохранение молекулярного кислорода в сердечной и скелетных мышцах. Электрохимический метод определения миоглобина основан на усилении сигнала этого гемопротеина при использовании электродов, модифицированных коллоидным золотом и на возникновении каталитического тока при взаимодействии миоглобина с кислородом. В присутствии кислорода каталитический ток, соответствующий восстановлению кислорода, возрастает. На рисунке 1А представлены циклические вольтамперограммы электродов ДДАБ/Au (пунктир) и ДДАБ/Au/миоглобин (сплошная линия) в аэробных условиях. При восстановительных катодных потенциалах в районе -460 мВ наблюдается максимум катодного тока, свидетельствующий о восстановлении гема миоглобина, иммобилизованного в мембрану ДДАБ/Au, и об электрокаталитическом восстановлении кислорода миоглобином, встроенном в мембрану ДДАБ/Au [22].

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОАНАЛИЗ КАРДИОМИОГЛОБИНА

На рис. 1Б представлена зависимость максимального катодного тока от скорости сканирования. Поскольку зависимость аппроксимируется прямой ($R^2 \approx 0,96$), можно предположить, что процесс, происходящий на электроде, на котором иммобилизован гемопrotein, является поверхностным, т. е. перенос электронов между электродом и миоглобином идет не в растворе, а непосредственно у поверхности электрода [23].

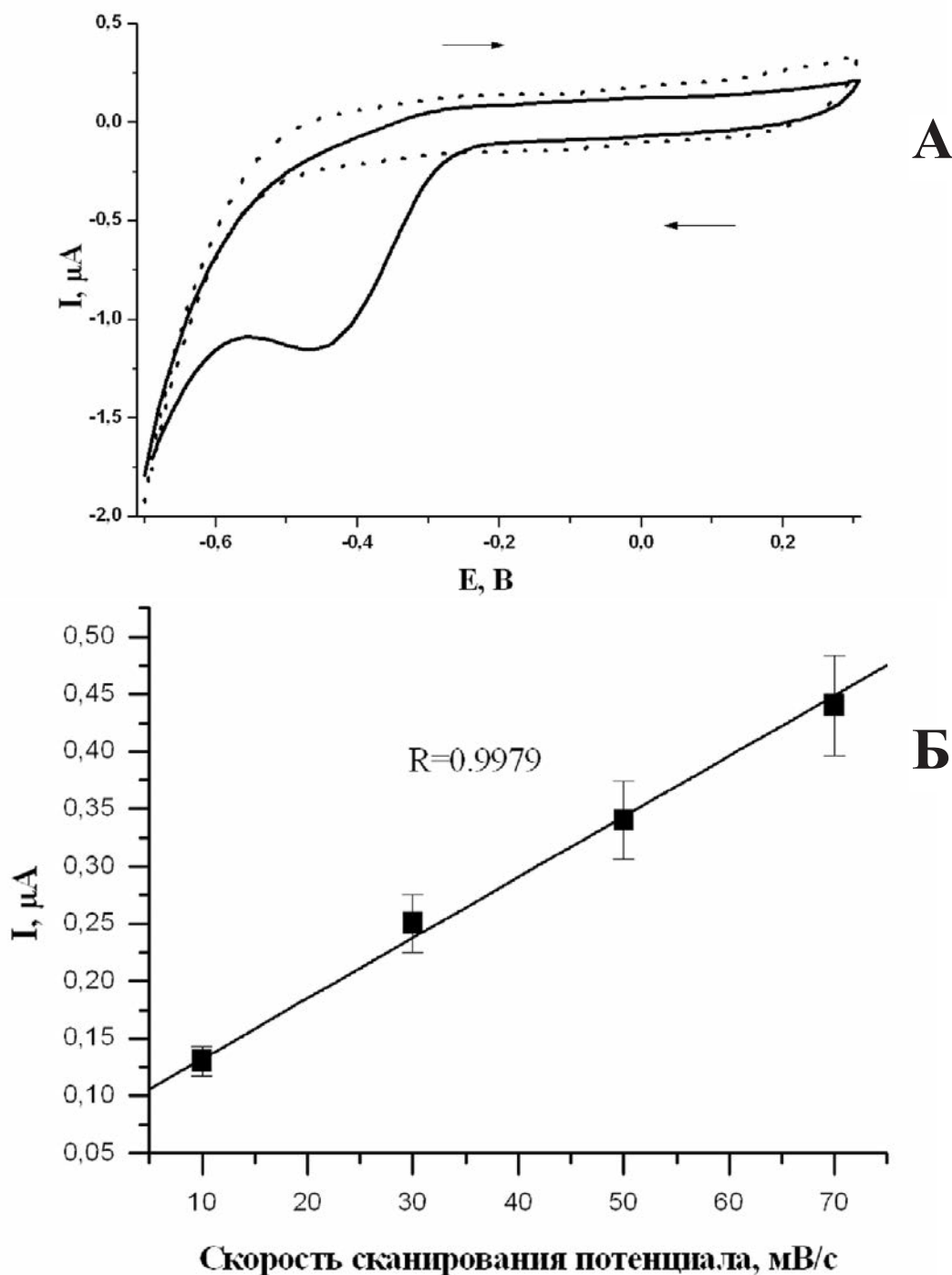
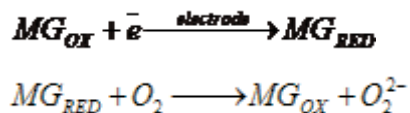


Рисунок 1.

А. Циклическая вольтамперограмма электродов ДДАБ/Аu (пунктир) и ДДАБ/Аu /миоглобин (сплошная линия) в аэробных условиях. Вольтамперограммы зарегистрированы на электродах, модифицированных 2 мкл 100 мкМ миоглобина, скорость развёртки 100 мВ/с. Объем электролита 1000 мкл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

Б. Зависимость катодного тока от скорости сканирования.

Отсутствие анодных токов окисления активного центра иллюстрирует протекание процесса электрокаталитического восстановления кислорода восстановленной формой белка. Данный факт свидетельствует о присутствии кислорода в мембране, окисляющего восстановленный белок по схеме:



Появление электрокаталитической катодной волны восстановления миоглобина было использовано в разработке биосенсора для его определения.

Для обеспечения возможности биораспознавания и обеспечения специфичности и селективности анализа электроды модифицировали антителами к миоглобину из сердечной мышцы человека. Для этого антитела иммобилизовали на поверхности ДДАБ/Au электродов. Антитела (АТ) взаимодействуют с золотыми наночастицами [12], по-видимому, за счет SH-групп, и эффективно встраиваются в мембрану ДДАБ.

Связывание миоглобина с антителами, иммобилизованными на электроде, исследовали различными электрохимическими методами. На рисунке 2 представлены спектры электрохимического импеданса в координатах Найквиста (рис. 2А) и в координатах мнимой части комплексной проводимости от частоты (рис. 2Б), зарегистрированные до и после инкубации ДДАБ/Au/АТ электродов с 0,1 мкМ раствором миоглобина. Для увеличения вклада диффузной части двойного электрического слоя в общий импедансный отклик, спектры измерялись в разбавленном растворе фоновых электролитов (0,01 М KCl). Инкубация с 0,1 мкМ раствором миоглобина (1,78 мкг/мл) приводит к изменению импедансного спектра. Данные на рисунке 2А аппроксимировали полукругами в рамках простейшей эквивалентной схемы, представленной на вставке к рисунку 2А. Инкубация с раствором миоглобина приводит к двукратному увеличению диаметра полукруга, равному сопротивлению переноса заряда ($R_{ПЗ}$). Таким образом, в результате связывания миоглобина с антителами происходит частичная блокировка поверхности. Инкубация с раствором антигена (миоглобина сердечной мышцы человека) приводит к подъёму точки максимума полукруга аппроксимации, что соответствует двукратному уменьшению ёмкости двойного электрического слоя ($C_{ДС}$). Более наглядно эффект уменьшения ёмкости можно представить в координатах мнимой проводимости от частоты (рис. 2Б). При этом частота максимума мнимой проводимости, обратно пропорциональная ёмкости двойного электрического слоя, увеличивается в два раза, смещаясь в сторону высоких частот. Инкубация с раствором антигена (миоглобина сердечной мышцы человека) приводит к увеличению эффективной толщины двойного электрического слоя, что выражается в падении ёмкости СДС. Таким образом, можно сделать вывод, что в результате инкубации электрода, модифицированного антителами в растворе антигена, происходит связывание молекул миоглобина на поверхности, что приводит к частичной блокировке поверхности и увеличению эффективной толщины двойного электрического слоя.

Для исследования аналитических характеристик использовали вольтамперные отклики датчика, регистрируемые с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии, (SWV) имеющей большую чувствительность и лучшее соотношение шум – сигнал по сравнению с циклической вольтамперометрией. На рисунке 3 приведена квадратно-волновая вольтамперограмма электродов ДДАБ/Au/кардиомиоглобин (17,8 мкг/мл, 1 мкМ). Наблюдается появление катодного пика при -280 мВ с амплитудой 3,22 нА, соответствующего гемопротейну в пленке DDAB/Au.

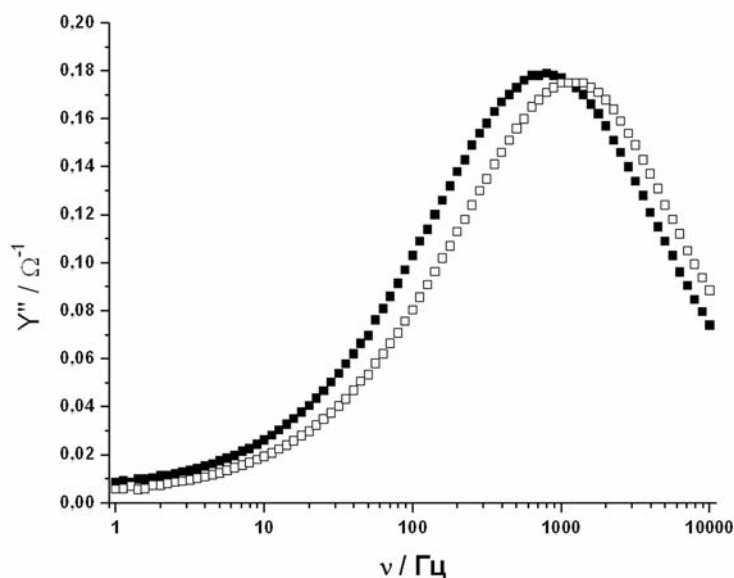
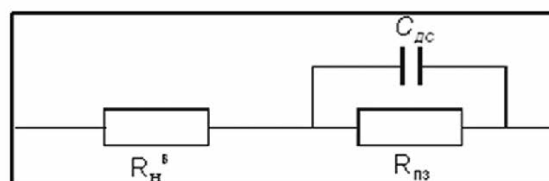
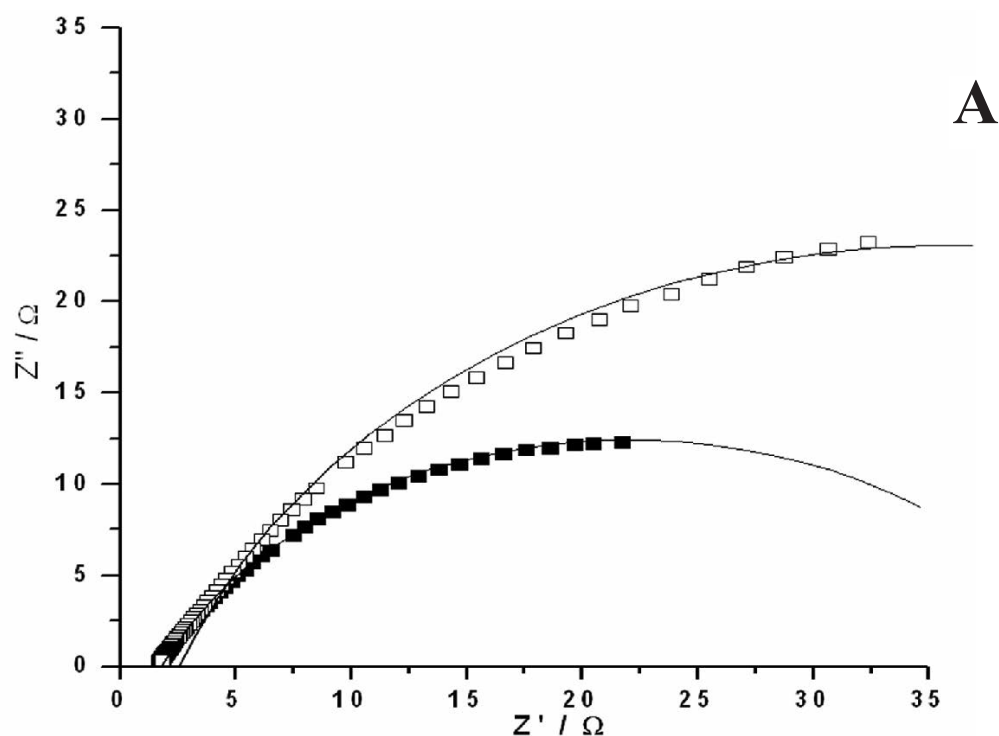


Рисунок 2.

Связывание миоглобина на электродах, модифицированных антителами к миоглобину из сердца человека. Спектры импеданса, зарегистрированные на электродах, модифицированных раствором антител (70 мкг/мл) до (■) и после (○) инкубации с 0,1 мкМ раствором миоглобина, представлены в координатах Найквиста (А) и в координатах мнимой проводимости от частоты (Б). Полуокруги на рис. 2А представляют собой линии аппроксимации в рамках модели, представленной на вставке к рис. 2А, где R_{Ω}^B - сопротивление омических потерь в объёме раствора, $C_{дс}$ - ёмкость двойного электрического слоя, а $R_{ПЗ}$ - сопротивление переноса заряда.

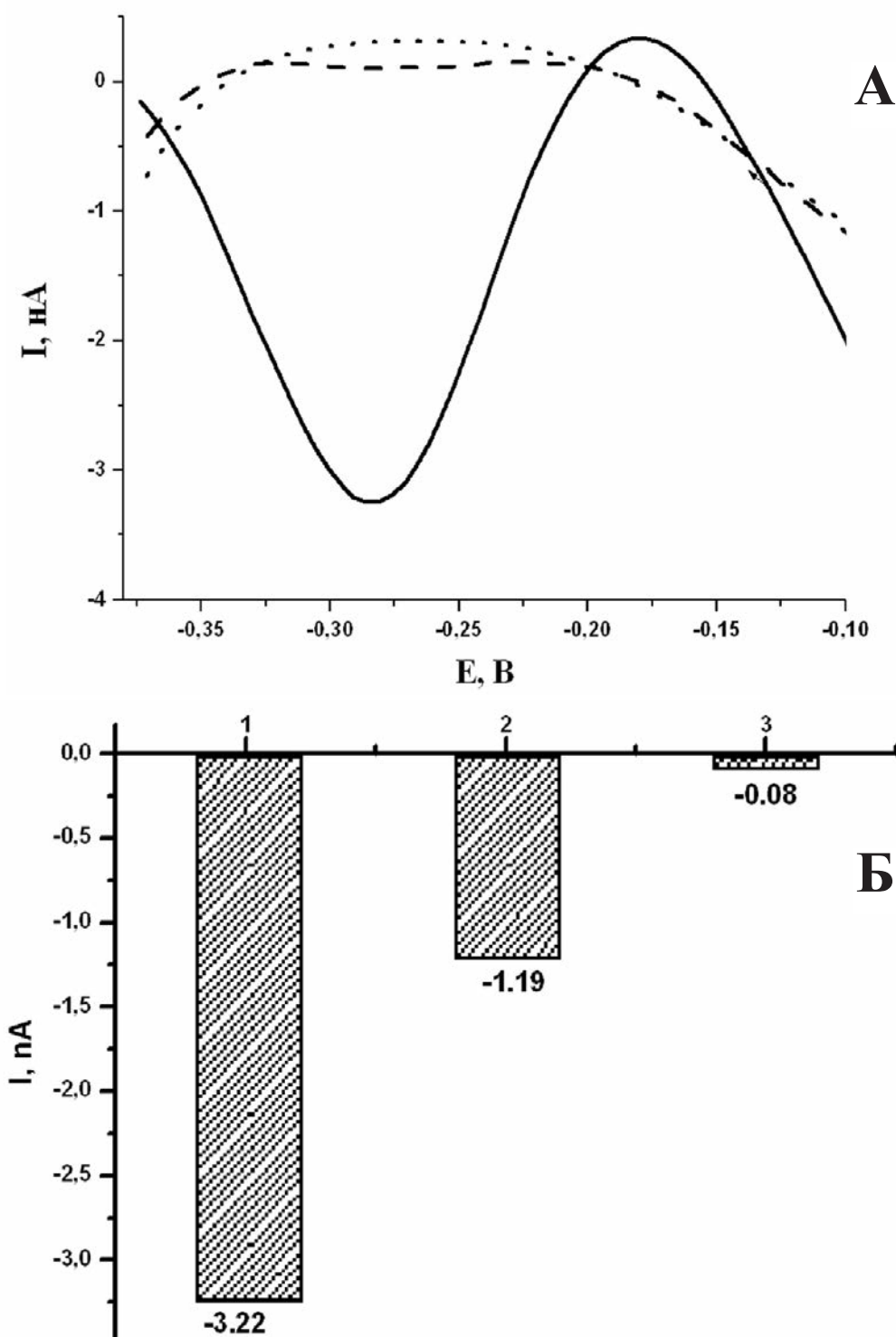


Рисунок 3.

Специфичность связывания антигена антителами к миоглобину сердца человека.

А. Квадратноволновые вольтамперограммы (амплитуда 50 мВ, частота 10 Гц) были зарегистрированы на электродах, модифицированных антителами (ДДАБ/Аи/АТ) (2 мкл раствора антител с концентрацией 70 мкг/мл) против миоглобина из сердца человека, после инкубации с 1 мкМ растворами миоглобина из сердца человека (сплошная линия) (ДДАБ/Аи/АТ/миоглобин), миоглобина из скелетных мышц кита (-----) и цитохрома *c* (.....).

Б. Максимальная амплитуда тока квадратноволновых вольтамперограмм, скорректированная по базовой линии для кардиомиоглобина (1), миоглобина из скелетных мышц кита (2), цитохрома *c* (3).

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОАНАЛИЗ КАРДИОМИОГЛОБИНА

Исследование ДДАБ/Au и ДДАБ/Au/миоглобин (1780 нг/мл, 100 нМ) электродов с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии также достоверно регистрирует катодный пик при -210 мВ. С помощью вольтамперометрического анализа (SWV и DPV) миоглобин, иммобилизованный на ДДАБ/Au электродах, регистрируется в катодной области (-210 ÷ -290 мВ) вольтамперограммы.

На рисунке 3 представлены также кривые, зарегистрированные после инкубации электродов, модифицированных антителами к кардиомиоглобину, в растворах кардиомиоглобина, миоглобина из скелетных мышц кита и в растворе цитохрома *c*. В случае инкубации с раствором кардиомиоглобина наблюдается катодный максимум тока квадратно-волновой вольтамперометрии, соответствующий редокс-активности миоглобина. В остальных случаях появления максимума не наблюдается. Таким образом, разрабатываемый сенсор обладает специфичностью по отношению к миоглобину из сердца человека, определяемой антителами. Исследование устойчивости отклика разработанного электрохимического биосенсора показало удовлетворительную стабильность: после трёх дней хранения при +4°C отклик датчика снизился на 4%.

На рисунке 4 представлен калибровочный график определения миоглобина с помощью анализа квадратно-волновых вольтамперограмм. Нижний предел обнаружения, определяемый как концентрация, при которой измеряемый отклик трехкратно превышал стандартное отклонение единичного измерения на предельно-низкой концентрации [24], составил 0,25 нМ (4,4 нг/мл). В отличие от прямого сэндвич-анализа с амперометрической регистрацией [13], рабочий диапазон разработанного датчика находится в области 4,4 – 1750 нг/мл и вполне перекрывает клинический диапазон определяемых концентраций миоглобина: 80-800 нг/мл [4, 5, 9].

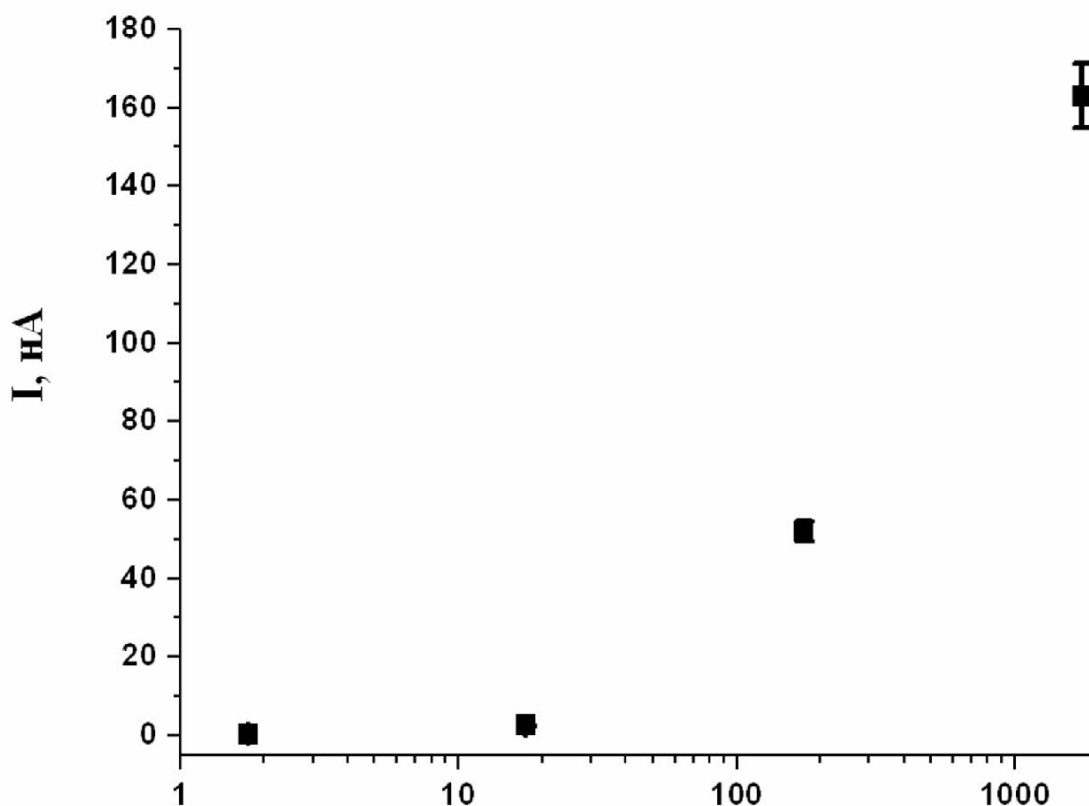


Рисунок 4.

Калибровочный график определения миоглобина. Приведена максимальная амплитуда тока квадратноволновых вольтамперограмм, скорректированная по базовой линии.

Комбинирование биораспознающего материала с наночастицами металлов для электрохимической регистрации аффинных взаимодействий – перспективное и быстроразвивающееся направление создания сенсоров. Наночастицы золота широко используются в качестве меток в “сэндвичевом” инверсионном анализе [23], так же как в качестве эффективного электрокатализатора для наноструктурирования поверхности электродов [16-19]. Поверхность золота может служить датчиком для детектирования биоаффинных взаимодействий [24, 25]. Для этого было применено свойство золотых электродов покрываться оксидной пленкой под действием высоких положительных потенциалов (около 1В) и ее последующее восстановление во время сканирования потенциала. Состояние золота на поверхности электрода чувствительно к модификации электрода биомолекулами, что следует из изменения высот и потенциалов максимумов окислительного и восстановительного пиков на циклических вольтамперограммах. На рисунке 5 представлены инверсионные вольтамперограммы электродов ДДАБ/Au/AT и ДДАБ/Au/AT/миоглобин. Связывание миоглобина с антителами на электродах приводит к изменению максимальной амплитуды катодного тока при восстановлении оксида золота. Необходимо отметить, что регистрируемые токи инверсионных вольтамперограмм для исследуемых типов электродов лежат в микроамперном диапазоне, что позволяет существенно повысить отношение сигнал/шум.

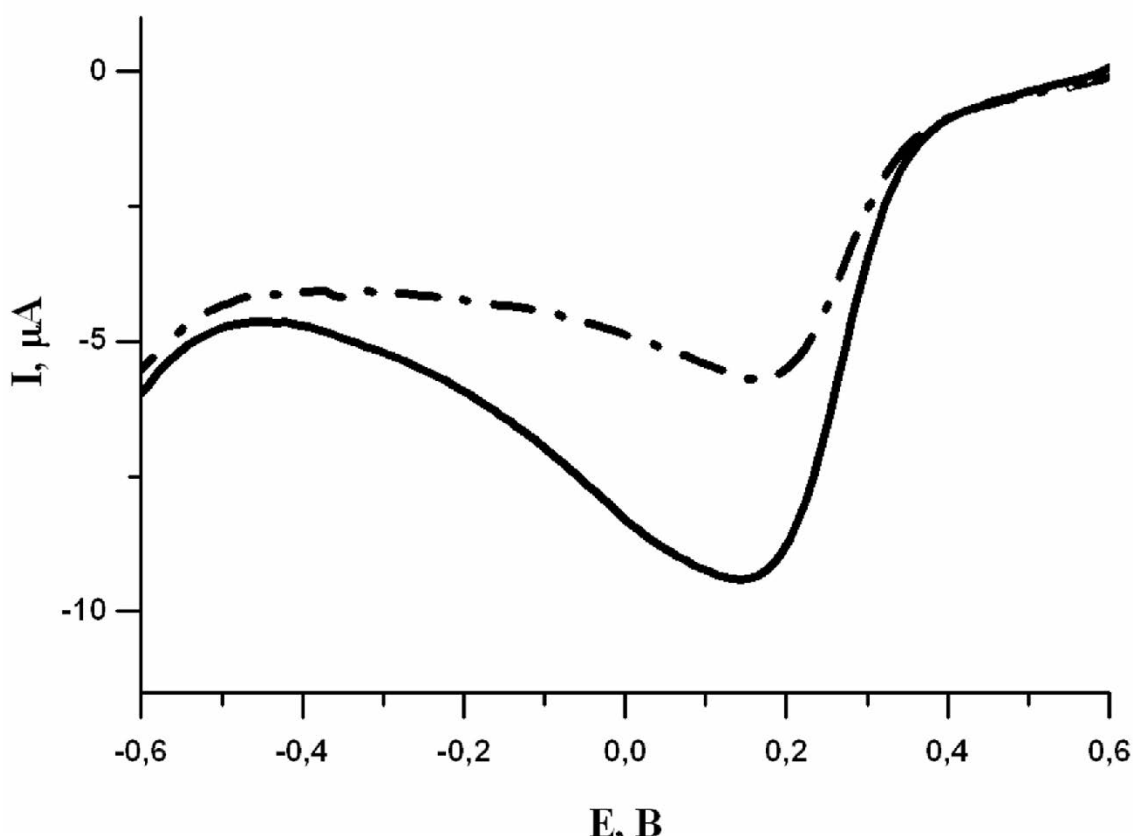


Рисунок 5.

Инверсионная вольтамперометрия электродов ДДАБ/Au/AT (---) и ДДАБ/Au/AT/миоглобин (сплошная линия). В опытах использовали 1 мкМ (17,5 мкг/мл) кардиомиоглобин. Катодный пик после стадии окисления золота ($E = +1,2$ В, 30 с), сканирование от 0,6 до -0,6 В, скорость сканирования 100 мВ/с. Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

ВЫВОДЫ. Прямой перенос электрона между электродом, модифицированным наночастицами золота, и миоглобином был использован для разработки электрохимического метода для безреагентной регистрации миоглобина. Моноклональные антитела к миоглобину из сердечной мышцы человека были иммобилизованы на электродах, полученных методом трафаретной печати и модифицированных золотыми наночастицами. Реакция биоаффинного связывания миоглобина с анти-миоглобином регистрировалась с помощью импедансной спектроскопии по изменению поверхностных свойств электрода. Аналитические параметры биосенсора исследовали с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии по регистрации восстановительного сигнала миоглобина. Электрохимический биосенсор на основе наноструктурированных электродов для определения миоглобина перспективен для анализа миоглобина в реальных объектах: плазме или сыворотке крови пациентов с ОИМ. Разработанный метод позволяет использовать данный формат анализа для ранней диагностики инфаркта миокарда, а именно: для определения миоглобина в случае концентраций, превышающих максимально допустимые концентрации миоглобина в организме здоровых людей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального Агентства по науке и инновациям Министерства образования и науки РФ (№ 02.512.11.2212, № 02.740.11.0306), гранта НШ-439.2008.4, а также Межведомственной Программы “Протеомика в медицине и биотехнологии”.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dolci A., Panteghini M.* (2006) *Clinica Chimica Acta*, **369**, 179-187.
2. *Yang Z., Zhou D.M.* (2006) *Clin. Pharmacol.*, **39**, 771-780.
3. *Collinson P.O., Gaze D.C.* (2007) *Heart, Lung and Circulation*, **16**, 71-82.
4. *Kagen L.J.* (1973) *Myoglobin: Biochemical, physiological and clinical aspects*, Colombiana University Press, New York – London.
5. *Harrison A., Amundsen S.* (2005) *Amer. J. Emerg. Med.*, **23**, 371-378.
6. *Groot M., Wodzing K.W.H., Simons M., Glatz J.F.C., Hermens W.Th.* (1999) *Cardiovasc. Res.*, **44**, 315-324.
7. *Wu A., Smith A., Chistenson R.H., Murakami M.A., Apple F.* (2004) *Clin. Chem Acta*, **346**, 211-219.
8. *Kurochkin S.N., Egorov A.M., Gavrilova E.M., Rubtsova M.Yu., Cherednikova T.V., Severin E.S.* (1985) *Adv. Enz. Reg.*, **23**, 377-386.
9. *Matveeva E.G., Gryczynski Z., Lakowicz J.R.* (2005) *J. Immunol. Meth.*, **302**, 26-35.
10. *Lakowicz J.R., Malicka J., D'Auria S., Gryczynski I.* (2003) *Anal. Biochem.*, **320**, 13-20.
11. *Matveeva E., Gryczynski Z., Malicka J., Gryczynski I., Lakowicz J.R.* (2004) *Anal. Biochem.*, **334**, 303-311.
12. *Piras L., Reho S.* (2005) *Sensors and Actuators B*, **111-112**, 450-454.
13. *O'Regan T.M., O'Riordan L.J., Pravda M., O'Sullivan C.K., Guilbault G.G.* (2002) *Anal. Chim. Acta*, **460**, 141-150.
14. *Wang J.* (2005) *Analyst*, **130**, 421-426.
15. *Murphy L.* (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 177-184.
16. *Pumera M., Sanchez S., Ichinose I., Tang J.* (2007) *Sensors and Actuators B*, **123**, 1195-1205.
17. *Guo S., Wang E.* (2007) *Analytica Chimica Acta*, **598**, 181-192.
18. *Compon R., Wildgoose G., Rees N., Streeter I., Baron R.* (2008) *Chem. Phys. Letters*, **459**, 1-17.
19. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A.I.* (2007) *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 859-865.

20. Berthell D., Brust M., Schiffrin D.J., Kiely C. (1996) *J. Electroanal. Chem.*, **409**, 137-143.
21. Han X., Cheng W., Zhang Z., Dong S., Wang E. (2002) *Biochem. Biophys. Acta*, **1556**, 273-277.
22. Rusling J.F., Nassar A.F. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11891-11897.
23. Bard A., Faulkner L.R. (1980) *Electrochemical Methods*, Wiley: New York.
24. Zhang J., Feng W., Lin L., Zhang F., Cheng G., He P., Fang Y. (2007) *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 341-347.
25. Suprun E., Shumyantseva V., Bulko T., Rachmetova S., Rad'ko S., Bodoev N., Archakov A. (2008) *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 831-836.

Поступила: 24. 06. 2009.

ELECTROCHEMICAL IMMUNOANALYSIS OF CARDIAC MYOGLOBIN

V.V. Shumyantseva, T.V. Bulko, M.Yu. Vagin, E.V. Suprun, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya Street, 10,
Moscow 119121, Russia tel.: +7 499-246 58 20; fax: +7 499-245 08 57;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Method targeting the direct monitoring of myoglobin based on analysis of electrochemical parameters of modified electrodes were proposed. Method of direct detection is based on interaction of myoglobin with anti-myoglobin with subsequent electrochemical registration of hemeprotein. Myocardial infarction biomarker myoglobin was quantified at biological level using screen printed electrodes modified with gold nanoparticles stabilized with didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) and antibodies. Proposed method did not require signal enhancement and amplification and also labeled secondary antibodies. Electro analysis has high specificity and sensitivity. Myoglobin -antibodies interaction was studied also with electrochemical impedance spectroscopy. Sensor has low detection limit and broad diapason of working concentrations (17.8 ng/ml - 1780 ng/ml; 1 nM - 10 nM). Method based on gold nanoparticles detection on the surface of electrodes was treated for myoglobin identification. AuNP worked as an electrochemical sensing platform: the oxidation of gold surface (resulted in gold oxide formation) upon polarization served as a basis for analytical response. The difference of cathodic peak area and peak high of gold oxide reduction in the case of electrodes with antibodies and electrodes with antibodies - myoglobin complex, was registered.

Key words: gold nanoparticles, myoglobin, cardiac biomarkers, stripping voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy.