

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 571.27

©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСОВ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО НА ПОВЕРХНОСТИ КАНТИЛЕВЕРА ДЛЯ СОЗДАНИЯ СЕНСОРНЫХ УСТРОЙСТВ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ

Д.В. Колесов^{1}, Г.А. Киселев^{1,2}, А.А. Кудринский³, И.В. Яминский^{1,3}*

¹ООО “Академия Биосенсоров”, ул. Строителей д. 4, корп. 5, Москва;
тел.: 8 (495) 926-37-59; эл. почта: kolesov@nanoscopy.ru

²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

С помощью метода микромеханических кантилеверных систем было исследовано взаимодействие комплексов антиген-антитело на твёрдой поверхности. Показано, что возникающее в результате взаимодействия антиген-антитело поверхностное натяжение в рецепторном слое может быть использовано для создания сенсорных устройств.

Ключевые слова: Взаимодействие антиген-антитело, антитела группы крови, микрокантилеверные сенсоры, поверхностное натяжение.

ВВЕДЕНИЕ. Существуют различные методы биодетекции, использующие в качестве измерительного элемента микрокантилеверный датчик [1]. Наномеханические кантилеверные системы, основанные на измерении поверхностного натяжения, являются перспективной платформой для создания нового типа биосенсоров прямого действия. Они имеют большой потенциал в плане разработки высокоселективных и высокочувствительных иммуносенсоров [2]. В таких сенсорах изменение свободной энергии поверхностного слоя рецептора в результате реакции молекулярного распознавания между антигеном и антителом преобразуется в механическую деформацию микрокантилеверного датчика. Цель работы заключалась в изучении особенностей взаимодействия комплексов антиген-антитело на поверхности кантилевера. Типичными иммунными комплексами, использованными в работе, являются пары антигенов и антител, определяющих группу крови в системе АВ0.

МЕТОДИКА. В работе использовались прямоугольные кремниевые кантилеверы CSG01 (ЗАО “НТИ”, г. Зеленоград) длиной 350 мкм, шириной 30 мкм и толщиной 1 мкм, покрытые с одной стороны слоем золота толщиной 30 нм. Измерения поверхностного натяжения проводили на установке, позволяющей работать с двумя кантилеверами одновременно. Золотую поверхность первого кантилевера через меркаптоантарную кислоту, активированную карбодиимидом, модифицировали антигеном Б. Второй кантилевер служил опорным, и был модифицирован антигеном А. Через ячейку прибора прокачивали разведенную в 300 раз нативную сыворотку моноклональных мышинных антител β, специфичных к антигену Б. В результате на поверхности первого кантилевера образовывались иммунные комплексы. Применение кантилевера сравнения,

* - адресат для переписки

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО НА КАНТИЛЕВЕРЕ

модифицированного антигеном А, позволяет учесть акты неспецифического связывания и другие факторы, влияющие на изгиб консоли. Таким образом, полезным сигналом является разность отклонений двух кантилеверов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1 приведена зависимость разности сил поверхностного напряжения от времени в процессе образования иммунных комплексов на поверхности кантилевера. Поверхностное натяжение имеет характер растяжения, то есть соответствует отталкиванию между образовавшимися комплексами. Основными механизмами возникновения сил между иммунными комплексами служат гидрофильное или гидрофобное взаимодействия, электростатическое взаимодействие, водородные связи или пространственное взаимодействие [3]. В нашем случае основным фактором, видимо, является последнее. Действительно, в слой, состоящий из небольших молекул антигенов, представляющих собой олигосахариды, встраиваются достаточно крупные белковые молекулы антител. Аналогичное поведение наблюдается при взаимодействии крупных антигенов ПСА с иммобилизованными на поверхности кантилевера специфичными антителами [4].

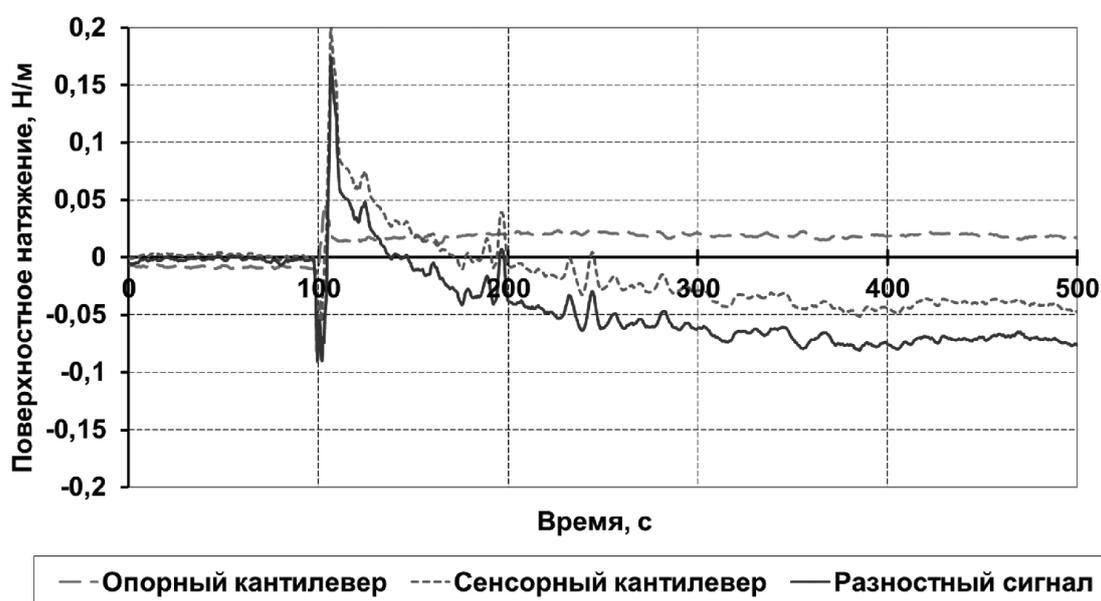


Рисунок 1.

Развитие сил поверхностного натяжения в процессе образования комплексов Аг-Ат на поверхности кантилевера.

Наблюдаемый сразу после введения резкий скачок на зависимости отклонения кантилевера от времени, вызван гидродинамическим ударом при вкачивании жидкости в ячейку и не несет какой-либо информации. Выход зависимости на плато соответствует образованию равномерного монослоя комплексов и установлению равновесия между концентрацией антител в растворе и на поверхности кантилевера. Итоговая разность сил поверхностного натяжения определялась как разность значений начального и после выхода на плато, и составила 0,075 Н/м. Быстрое время выхода зависимости на плато, составившее около 5 минут, обусловлено большой концентрацией антител в растворе и согласуется с высокой скоростью протекания иммунной реакции.

Для регенерации рецепторного слоя использовали 10% раствор мочевины, вызывающий денатурацию белка, что приводит к разрушению комплекса антиген-антитело. В растворе мочевины кантилеверы выдерживались около 2-х ч.

Повторное введение образца той же концентрации приводило к качественному повторению зависимости (рис. 2). Однако итоговая разность сил поверхностного натяжения составила 0,063 Н/м, а время выхода на плато увеличилось до 11 мин. Снижение характеристик сенсорного слоя свидетельствует о его неполной регенерации либо деградации в результате обработки раствором мочевины.

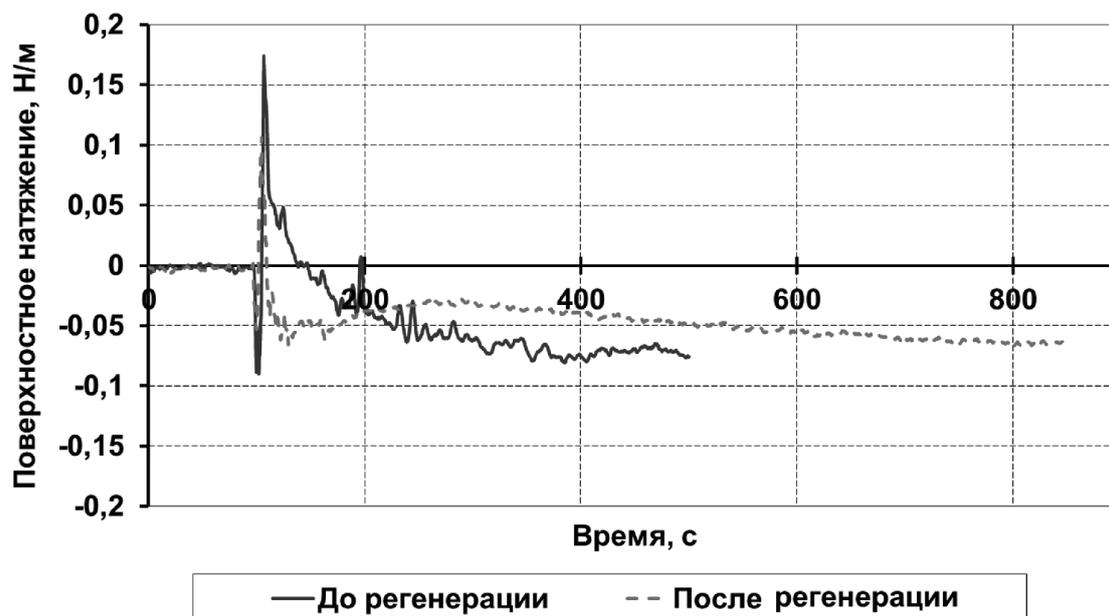


Рисунок 2.

Зависимость поверхностного натяжения от времени в процессе образования комплексов Ag-At на поверхности кантилевера до и после регенерации сенсорного слоя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В работе было показано, что связывание специфических антител из раствора с молекулами антигена, иммобилизированными на поверхности микромеханического датчика приводит к возникновению сил отталкивания между образовавшимися комплексами. Возникающее в результате поверхностное натяжение на модифицированной поверхности кантилевера может служить полезным сигналом при создании сенсорных устройств для определения белковых молекул.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы» ГК №16.512.11.2265.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A., Ivanov Yu., Lisitsa A., Zgoda V. (2009) *Proteomics*, **9**, 1326–1343.
2. Dauksaite V., Lorentzen M., Besenbacher F., Kjems J. (2007) *Nanotechnology*, **18**(1-5), 125503.
3. Veselovsky A.V., Ivanov Yu.D., Ivanov A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P. (2002) *J. Mol. Recognit.*, **15**, 405–422.
4. Wu G.H., Datar R., Hansen K., Thundat T., Cote R., Majumdar A. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 856-860.

Поступила: 03. 09. 2012.

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN ANTIGEN-ANTIBODY COMPLEXES
FOR LABEL-FREE SENSOR APPLICATION

D.V. Kolesov¹, G.A. Kiselev^{1,2}, A.A. Kudrinskiy³, I.V. Yaminskiy^{1,3}

¹Biosensor Academy, ul. Stroiteley., 4, bld. 5, Moscow, Russia; tel.: +7 (495) 926-37-59;
e-mail: kolesov@nanoscopy.ru

²A.N. Frumkin Institute of physical chemistry and electrochemistry RAS, Moscow, Russia

³M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Nanomechanical cantilever systems have a great potential in design of the new type of label-free immunosensors. They are based on the conversion of free energy change of the surface layer of the receptor by the reaction of molecular recognition between the antigen and antibody into mechanical deformation of microcantilever. But the mechanisms of molecular interactions in the layer are still not clear.

Key words: antigen-antibody interaction, AB0 blood group, microcantilever sensor, surface stress.