БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 1, с. 17–23

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.322.9

К ВОПРОСУ О ВЫБОРЕ БЛОКИРУЮЩЕГО БЕЛКОВОГО АГЕНТА ПРИ СОЗДАНИИ МЕТОДА ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОВЕРХНОСТНО-УСИЛЕННОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2019 г. А.Ю. Субекин, В.И. Кукушкин*, Т.И. Новожилова, С.П. Мамонтов, Л.В. Кулик*, Р.А. Хрусталёв

Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии, 111024, Москва, шоссе Энтузиастов, 23

**Институт физики твердого тела РАН, 142432, Черноголовка Московской области, ул. Академика Осипьяна, 2*

E-mail: kukushvi@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2019 г.
После доработки 10.07.2019 г.
Принята к публикации 22.08.2019 г.

Целью работы является выбор блокирующего белкового агента для проведения быстрого и чувствительного иммунохимического анализа с использованием метода SERS (поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии). Для усиления сигнала рамановского рассеяния света от белковых структур использована оптимизированная наноостровковая металл-диэлектрическая SERS-структура, а для измерения спектров усиленного оптического отклика использовался рамановский спектрометр с широким выходным лазерным пучком с длиной волны 532 нм. В результате проведенной работы были оптимизированы SERS-подложки для получения высокоинтенсивного поверхностно-усиленного рамановского рассеяния света от используемой в исследованиях метки (ТРИТЦ – тетраметилродамина изоцианат), также были изучены параметры адсорбции белков, традиционно используемых в твердофазном иммунохимическом анализе, и выбраны оптимальные – бычий сывороточный альбумин и казеин. Показано, что при адсорбционном взаимодействии белка и SERS-поверхности действуют закономерности, описанные в классической адсорбционной теории.

Ключевые слова: рамановское рассеяние света, SERS, биосенсор, иммунохимический анализ, адсорбция белков.

DOI: 10.31857/S0006302920010020

В последнее время области и объемы использования рамановской спектроскопии стремительно расширяются. Этот вид оптической спектроскопии является уникальным и мощным инструментом для осуществления неразрушающего экспресс-метода в целях идентификации химических веществ и фармацевтических препаратов [1], обнаружения взрывчатых [2] и наркотических веществ [3], клинического исследования биологических тканей и жидкостей [4], медицинской диагностики состояния тканей [5] и др.

Главная причина рамановского рассеяния света в веществах заключается в том, что свет – это электромагнитная волна, в высокочастотном электрическом поле которой происходят осцилляции дипольного момента молекул. Все органические молекулы имеют характерные наборы низкочастотных колебаний. Низкочастотное внутримолекулярное колебание атомов модулирует высокочастотное колебание осциллирующего (и поэтому излучающего) дипольного момента молекул. Из-за этого в спектре рассеянного света появляются частотные компоненты, сдвинутые относительно частоты лазерного излучения на характерные частоты внутримолекулярных колебаний. Этот рамановский сдвиг позволяет однозначно распознавать разнообразные вещества.

Однако чувствительность рамановских методов детектирования различных молекулярных субстанций является чрезвычайно низкой, так как вероятность стоксовой компоненты рамановского рассеяния света составляет 10^{-6}, что ставит

Сокращения: SERS – surface-enhanced Raman scattering (поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия), БСА – бычий сывороточный альбумин, ТРИТЦ – тетраметилродамина изоцианат.

под сомнение возможность использования рамановской спектроскопии для детектирования низких концентраций веществ. Эту ситуацию можно радикально изменить, если исследуемые молекулы нанести, к примеру, вблизи границы раздела металла и диэлектрика, на которой формируются поверхностные плазмон-поляритоны и происходит фокусировка электромагнитного излучения вблизи границы раздела этих сред. При взаимодействии молекул веществ, находящихся на таких поверхностях, с усиленным электромагнитным полем происходит значительное увеличение интенсивности рамановского рассеяния света – в 10^5–10^7 раз [6]. Это явление называется поверхностно-усиленным рамановским рассеянием света (в англоязычной литературе SERS – surface-enhanced Raman scattering) и используется при создании биосенсоров. Эти биосенсоры являются чрезвычайно перспективными для решения задач по высокочувствительному и быстрому детектированию белковых молекул при проведении иммунохимического анализа [7]. Применение SERS-репортеров, т. е. молекул, обладающих индивидуальным высокоинтенсивным рамановским спектром, в качестве маркеров исследуемых белков способствует дополнительному усилению сигнала [8].

Оптимизация методов иммунного анализа с использованием SERS-биосенсоров особенно актуальна для создания чувствительной, селективной и быстрой диагностики различных патогенов, что имеет первостепенное значение при обеспечении экологической и биологической безопасности, а также в случаях, требующих неотложной медицинской помощи. SERS-биосенсоры можно рассматривать как хорошую альтернативу широко применяемым в настоящее время методам твердофазного иммуноферментного анализа, которые, к сожалению, не являются экспресс-методами.

При создании высокочувствительной методики детектирования белков на основе поверхностно-усиленного рамановского рассеяния света в первую очередь необходимо выбрать длину волны лазерного излучения. Важность правильного выбора обусловлена несколькими причинами. Возбуждение рамановского рассеяния света высокочастотным лазерным излучением по сравнению с низкочастотным излучением имеет на порядок большую эффективность вследствие выраженной частотной зависимости рамановской активности молекул. Кроме этого, чувствительность (квантовая эффективность) кремниевых матриц-детекторов является функцией длины волны излучения. Максимум их чувствительности приходится на диапазон 450–550 нм. К тому же при фотовозбуждении с длинами волн 350–500 нм помимо рамановского сигнала возникает интенсивная фотолюминесценция, которая препятствует надежному измерению рамановского рассеяния света. Самый простой способ подавления сигнала фотолюминесценции заключается в уменьшении энергии фотонов накачки (ниже характерной ширины запрещенной зоны молекулы). И наконец, чувствительность рассматриваемого метода может быть значительно увеличена за счет эффектов резонансной рамановской спектроскопии. Традиционные наноостровковые металл-диэлектрические SERS-подложки имеют пик плазмонного поглощения на длинах волн 450–600 нм. По этим причинам наиболее целесообразным представляется использование лазерного излучения в диапазоне длин волн 500–550 нм для детектирования SERS-сигналов исследуемых веществ.

После выбора длины волны лазерного излучения второй важной задачей в процессе создания метода иммунохимического анализа на основе SERS-эффекта является подбор блокирующего агента. При проведении теста свободные сайты на поверхности твердой фазы, не связанные с анализируемым антигеном, могут неспецифически фиксировать меченые антитела, что приводит к повышению фонового сигнала. Для предотвращения неспецифического связывания после иммобилизации на твердую фазу аналита проводят обработку нейтральными для теста веществами – блокирующими агентами.

К блокирующим агентам предъявляются следующие требования:

– отсутствие конкуренции с антигеном за центры адсорбции на поверхности;

– отсутствие маскирующих для антител свойств;

– большая аффинность к поверхности по сравнению с антителами;

– инертность по отношению к антителам, отсутствие перекрестного взаимодействия.

Приемлемый блокирующий агент подбирается для конкретного исследования в процессе оптимизации методики. Широкое распространение в иммуноферментном анализе получили такие вещества, как бычий сывороточный альбумин (БСА) [9], казеин [2], обезжиренное молоко [10] и ряд других. В случаях, когда аналитический отклик сильно зависит от расстояния между SERS-репортером и поверхностью с плазмонными свойствами [6], на которой образуется иммунный комплекс, рекомендуется применять в качестве блокирующих агентов низкомолекулярные вещества, например глутатион [11] и подобные ему соединения, содержащие амино- или сульфгидрильную группы.

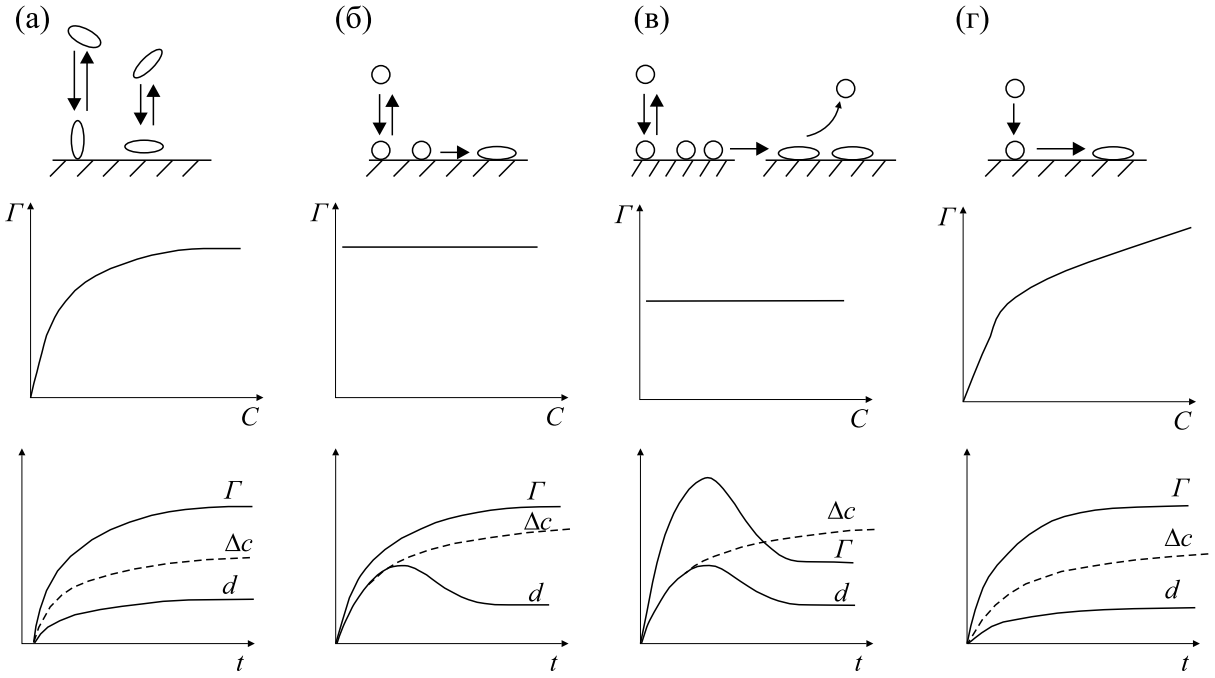

Рис. 1. Возможные процессы взаимодействия белков с поверхностью с соответствующими им изотермами и кинетическими кривыми адсорбции [14]. Γ – количество адсорбированного белка; Δc – количество необратимо адсорбированного белка; d – толщина белкового слоя.

Ключевым моментом при создании метода иммунного анализа является изучение адсорбции его компонентов. На сегодняшний день существует множество работ, посвященных адсорбционному взаимодействию белков с различными поверхностями (кремнезем, силикагель, различные пластики для иммуноферментного анализа) и влиянию условий адсорбции [12,13]. Известны модели адсорбции белков из одно- и многокомпонентных систем, созданные на основании теоретических расчетов уравнения Лэнгмюра и на многочисленных экспериментальных данных [14]. В этой работе представлена обширная теоретическая база для понимания процессов адсорбции белков из растворов на поверхности твердых фаз различной природы (пластик, стекло и др.). Выкладки с описанием возможных процессов взаимодействия белков с поверхностью, заслуживающие особого внимания в рамках нашей статьи, представлены на рис. 1.

Из представленных на рис. 1 данных автор делает вывод, что при отсутствии белок-белкового взаимодействия на поверхности сорбента адсорбция белка соответствует изотерме Лэнгмюра и гладкой кинетической кривой (рис. 1а). В случае если молекулы белка обратимо адсорбируются в одном конформационном (или ориентационном) состоянии, но затем часть из них может перейти в необратимо адсорбированное состояние (рис. 1б), кинетическая кривая также соответствует изотерме Лэнгмюра, однако толщина белкового слоя на поверхности твердой фазы вследствие переориентации молекул становится меньше. Изменение ориентации молекулы с увеличением площади адсорбции приводит к увеличению десорбции белка (рис. 1в), что соответствует наличию локального максимума на кинетической кривой и уменьшению толщины белкового слоя на поверхности твердой фазы. И наконец, когда все адсорбированные молекулы, изменяя конформацию, переходят в необратимо адсорбированное состояние (рис. 1г), кинетические кривые имеют не пологий наклон, как в классической кривой, а скорее похожи на прямую, меняющую угол наклона [14]. Таким образом, при создании метода анализа белковых структур, в котором существенную роль играют адсорбционные процессы, необходимо правильно выбрать эффективный блокирующий агент, изучить его адсорбцию как индивидуально, так и в присутствии других иммунореагентов для понимания их взаимодействия друг с другом на поверхности в условиях эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Для измерения спектров рамановского рассеяния света использовали рамановский спектрометр EnSpectr SERS R532 (Enhanced Spectrometry, США) с широким выходным лазерным пучком, который за одно измерение проводил усреднение сигнала со

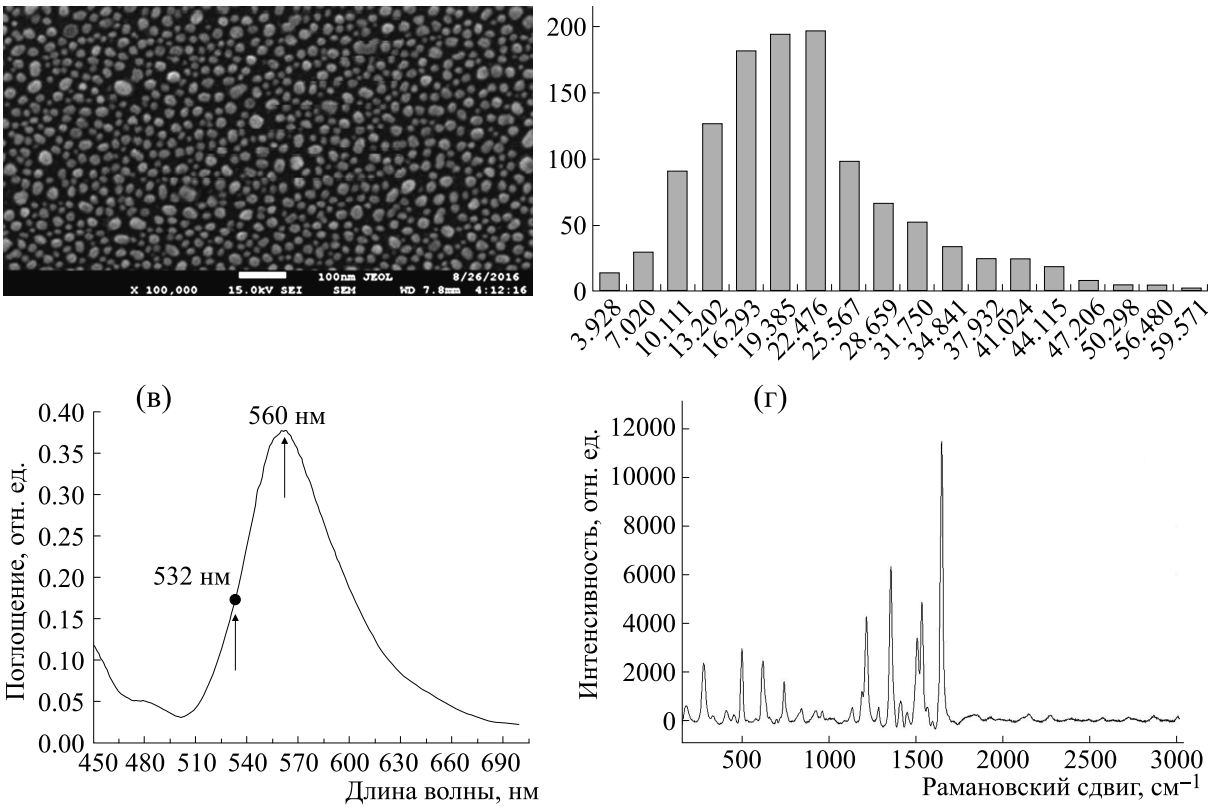

Рис. 2. (а) – Микрофотография поверхности островковой SERS-подложки, полученная на сканирующем электронном микроскопе; (б) – гистограмма распределения наночастиц по размерам; (в) – спектр поглощения SERS-подложки; (г) – SERS-спектр ТРИТЦ на полученной подложке.

всей площади SERS-зон (4 мм^2) и тем самым минимизировал ошибку измерения, связанную с неоднородностью распределения молекул по поверхности подложки. Длина волны лазерного излучения составляла 532 нм, мощность – 30 мВт, спектральный диапазон – 100–4000 см$^{-1}$, спектральное разрешение – 6 см$^{-1}$.

2. SERS-структуру для детектирования белковых структур в низких концентрациях формировали на поверхности кремния с выращенным слоем оксида кремния SiO_2 с помощью установки вакуумного термического напыления NANO 38 (скорость напыления серебра – 0,4 Å/с, толщина эквивалентной пленки 60 Å) и последующим термическим отжигом при температуре 120°C в течение 6 мин.

3. БСА, папаин и флуоресцентный краситель тетраметилродамина изоцианат (ТРИТЦ) получены от компании Sigma-Aldrich (США), а казеин от компании Serva (Германия).

4. Меченые белки синтезировали в соответствии со стандартной методикой [15].

5. Адсорбцию меченых белков (БСА, казеин, папаин) проводили погружением подложки в их растворы с концентрацией 0,1 мг/мл в физиологическом фосфатном буфере (pH 7,4). После экспозиции проводили промывку дистиллированной водой, подложку высушивали на воздухе и измеряли SERS-сигнал (по пику ТРИТЦ при 1640 см$^{-1}$). Процедуру повторяли до достижения суммарного времени адсорбции 60 мин.

6. Десорбцию белков проводили погружением подложки с иммобилизованным меченым белком (сигнал предварительно измеряли) в раствор тритона X-100 с концентрацией 0,2% в фосфатном физиологическом буфере, подложку выдерживали определенное время, ополаскивали дистиллированной водой от избытка буфера, высушивали на воздухе, после чего проводили измерение сигнала. Процедуру повторяли до достижения суммарного времени десорбции 60 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По разработанной нами методике были получены и охарактеризованы серебряные SERS-субстраты на основе оксида кремния. Результаты этой работы представлены на рис. 2.

Как видно на фотографии (рис. 2а), при напылении серебра толщиной эквивалентной пленки 60 Å с последующим термическим отжигом подложки при 120°C поверхность SERS-зон покрывалась серебряными гранулами, средний размер

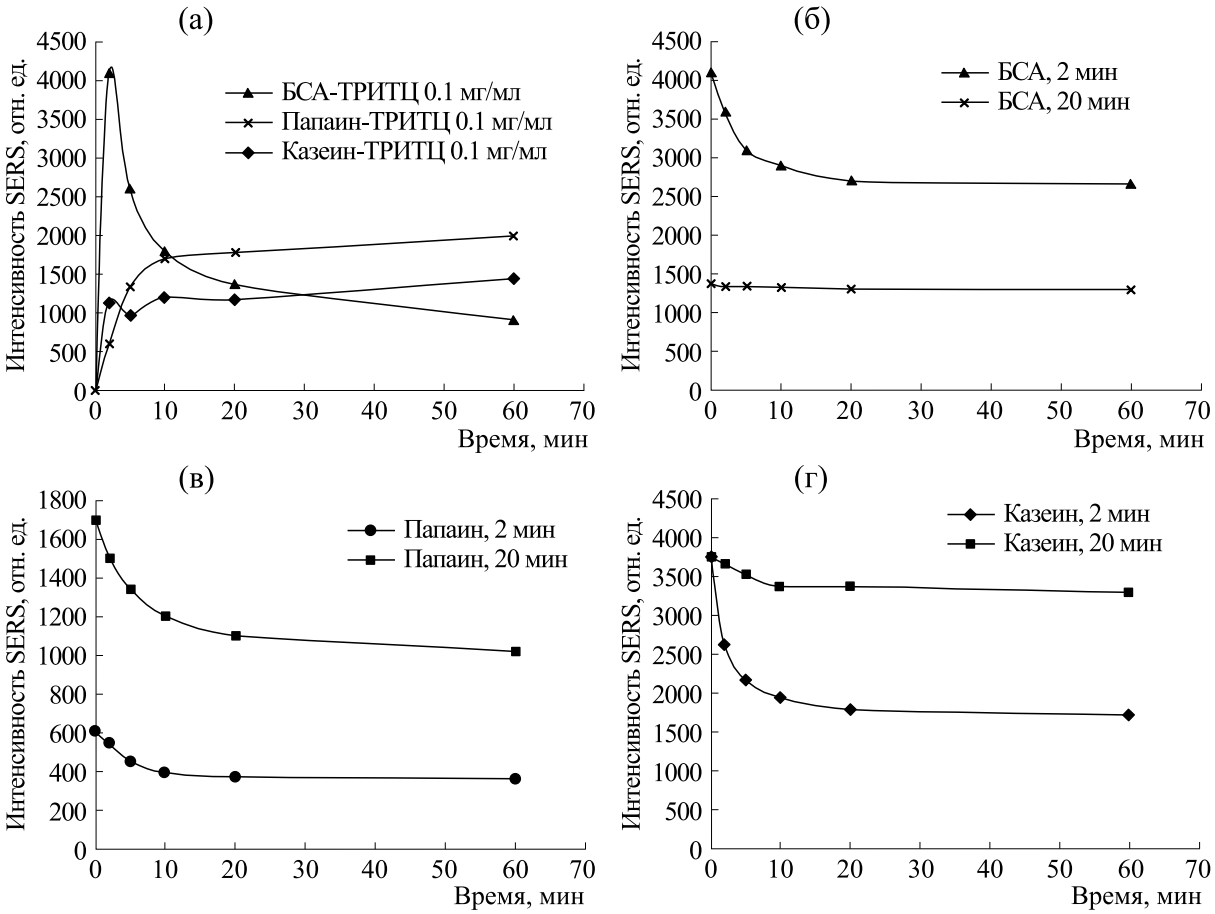

Рис. 3. (а) – Кинетические кривые адсорбции белков, (б) – кинетические кривые десорбции БСА, (в) – кинетические кривые десорбции папаина, (г) – кинетические кривые десорбции казеина.

которых в плоскости подложки составлял 23 нм (рис. 2б), средняя высота гранул – 8 нм, средний зазор между ними – 22,5 нм. Диэлектрические проницаемости серебра и оксида кремния обеспечивают подстройку пика плазмонного поглощения (рис. 2в) данной SERS-структуры (560 нм) вблизи длины волны выбранного нами лазерного излучения (532 нм). Нанесенное на подложку вещество ТРИТЦ показало высокоинтенсивный усиленный сигнал рамановского рассеяния света (рис. 2г).

Таким образом, полученные SERS-подложки удовлетворяют требованиям по дисперсности частиц по форме и размеру, а также дают равномерное распределение кластеров по поверхности. Спектр поверхностно-усиленного рамановского рассеяния света от используемого в исследованиях красителя показывает хорошую интенсивность.

Для выбора блокирующего агента, пригодного для последующего создания метода иммунного анализа с использованием SERS-детекции, изучали параметры адсорбции некоторых белков, традиционно используемых в твердофазном иммуноферментном анализе. Результаты этого исследования представлены на рис. 3.

Из данных рис. 3а следует, что БСА соответствует адсорбционной модели, представленной на рис. 1в. Сначала под действием градиента концентрации на подложку адсорбируется максимальное количество белка. Однако большая часть белковых молекул адсорбирована обратимо. Далее следуют конформационные изменения белковых молекул на поверхности подложки или их переориентация относительно поверхности ввиду геометрической анизотропии. В результате действия того или иного процесса происходит десорбция обратимо связанных молекул с поверхности подложки и на кинетической кривой адсорбции наблюдается локальный максимум. Папаин ведет себя по классической модели адсорбции Лэнгмюра (рис. 1а), что говорит о том, что большинство молекул связано с SERS-подложкой обратимо. Казеин ведет себя согласно модели, близкой к рис. 1в. Наличие локального максимума на кинетической кривой адсорбции

казеина можно связать с конформационными/ориентационными перестройками белковых молекул, переходящих в необратимо связанное состояние, и частичной десорбцией.

Были поставлены опыты (рис. 3б–г) по десорбции каждого из белков (см. раздел «Материалы и методы», п. 6). Из данных рисунков следует, что десорбция присутствует в каждом опыте и с течением времени достигает своего предела, соответствующего необратимо связавшемуся количеству белка. На рис. 3б видно, что при адсорбции БСА на SERS-подложку в течение 2 мин белок смывается с подложки интенсивнее, чем при времени его адсорбции 20 мин. Остаточный сигнал соответственно составил 65 и 95% от исходного. На рис. 3в видно, что папаин десорбируется с подложки одинаково хорошо для обеих точек адсорбционной кривой, остаточный сигнал по отношению к исходному составил 59% в случае 2 мин и 62% – для 20 мин адсорбции. Из рис. 3г следует, что казеин, аналогично БСА, хорошо смывается с подложки при времени его адсорбции 2 мин и практически полностью остается прикрепленным при времени его адсорбции 20 мин. Остаточный сигнал составил 75 и 95 % соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проделанной работы были получены SERS-подложки, дающие значительное усиление рамановского сигнала выбранной для аналитических целей метки (ТРИТЦ). На них были изучены адсорбционные свойства белковых веществ, наиболее часто употребляемых в качестве блокирующих агентов в классическом иммуноферментном анализе. Показано, что при адсорбционном взаимодействии белка и SERS-поверхности действуют закономерности, описанные в классической адсорбционной теории.

Из полученных данных следует, что при достижении равновесного состояния БСА и казеин являются необратимо адсорбированными на поверхности SERS-подложек. Интерпретация кинетических кривых адсорбции хорошо коррелирует с данными по десорбции белков. В момент времени, когда еще не достигнута точка локального максимума (2 мин, рис. 3а), существенная часть белковых молекул адсорбирована обратимо, а после достижения равновесного состояния практически все молекулы переходят в необратимо связанное состояния. Приведенные выше данные по десорбции (рис. 3б,г) подтверждают это. При адсорбции папаина отношение необратимо адсорбированных молекул к общему их числу примерно всегда одинаково и составляет около 60% вне зависимости от того, достигнуто состояние равновесия или нет (рис. 3в).

По результатам работы можно сделать вывод о том, что в качестве блокирующих агентов для иммунного анализа с применением SERS-эффекта предпочтительнее использовать БСА или казеин, так как высокое удельное содержание необратимо адсорбированных молекул дает основания полагать, что при постановке метода применяемый белок не будет частично или полностью вытеснен с поверхности антителами к исследуемому аналиту.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-72-30003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Kudelski, Talanta **76** (1), 1 (2008).
2. R. Monjezi, S. Tan, B. Tey, et al., J. Virol. Methods **187** (1), 121 (2013).
3. M. Sanles-Sobrido, L. Rodríguez-Lorenzo, and S. Lorenzo-Abalde, Nanoscale **1** (1), 153 (2009).
4. S. Stockel, J. Kirchhoff, U. Neugebauer, et al., J. Raman Spectroscopy **47** (1), 899 (2016).
5. G. W. Auner, S. K. Koya, C. Huang, et al., Cancer Metastasis Rev. **37** (4), 691 (2018).
6. A. Wokaun, H.-P. Lutz, A. P. King, et al., J. Chern. Phys. **79** (1), 509 (1983).
7. A. Kaminska, E. Witkowska, K. Winkler, et al., Biosens. Bioelectron. **66**, 461 (2015).
8. K. Faulds, W. E Smith., and D. Graham, Anal. Chem. **76** (2), 412 (2004).
9. B. Dan, Zh. Huisheng, Y. Guangxin, and P. Xianyin, Anal. Methods **7** (1), 99 (2015).
10. T. Kuczius, K. Becker, A. Fischer, et al., Anal. Biochem. **431** (1), 4 (2012).
11. D. V. Rodrigo, J. Liu, C. Zhou, et al., ACS Appl. Mater. Interfaces **6** (15), 11829 (2014).
12. Т. Д. Хохлова, Вестн. МГУ. Сер. Химия **43** (3), 144 (2002).
13. Н. А. Эльтекова и А. Ю. Эльтеков, Физикохимия поверхности и защита материалов **46** (1), 56 (2010).
14. В.И. Севастьянов, *Биосовместимость* (ИЦ ВНИИгеосистем, М., 1999).
15. Л. И. Казакова, А. В. Дубровский, И. М. Санталова и др., Биоорган. химия **38** (1), 64 (2012).

Choice of Protein Blocking Agent in Development of a Method for Immunochemical Assay Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

A.Yu. Subekin*, V.I. Kukushkin, T.I. Novozhilova*, S.P. Mamontov*, L.V. Kulik**, and R.A. Khrustalev***

**State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, shosse Entuziastov 23, Moscow, 111024 Russia*

***Institute of Solid State Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Ossipyana 2, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

The aim of the work is to choose a protein blocking agent for fast and sensitive immunochemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy. An optimized SERS-based metal-dielectric nanostructure was used to obtain higher enhancement factor of Raman scattering protein molecules, and a Raman spectrometer with a wide output, imaged with the 532 nm laser line was employed to measure enhanced optical spectra of molecular adsorbates. Ultimately, SERS-substrates were optimized to obtain high-intensity surface-enhanced Raman scattering from the dye used in the studies (Tetramethylrhodamine isothiocyanate). Parameters of the adsorption process of proteins typically used in solid-phase immunochemical analysis were explored, and bovine serum albumin and casein were chosen for optimum assay results. It is shown that the interaction of a protein and SERS substrate during adsorption occurs according to classical theoretical description of adsorption.

Keywords: Raman scattering, SERS, biosensor, immunochemical analysis, protein adsorption