

УДК 57.088.1

ОБРАБОТКА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАН В ТЛЕЮЩЕМ РАЗРЯДЕ ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИММУНОАНАЛИЗА

© 2023 г. П.А. Петрова*, С.В. Замалутдинова*, А.А. Внукова*, Д.А. Алексеева*, Д.В. Багров*.*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

*E-mail: bagrov@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 31.03.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Обработка поверхности плазмой может использоваться для ее гидрофилизации и улучшения ее сорбционных свойств. В данной работе показано, что обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде улучшает адсорбцию антител в 15–17 раз, а также приблизительно на порядок повышает чувствительность иммуноанализа (дот-блоттинга), выполняемого на таких мембранах. Это продемонстрировано на примере иммуноанализа на интерлейкин-1 бета с хемилюминесцентной детекцией. Обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде не сопровождалась изменениями их структуры или химического состава, о чем свидетельствуют данные сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии соответственно. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации существующих лабораторных процедур, прежде всего дот-блоттинга.

Ключевые слова: нитроцеллюлоза, иммуноанализ, мембрана, чувствительность, антитела, интерлейкин.

DOI: 10.31857/S000630292303002X, EDN: FPIRBX

Дот-блоттинг — это метод молекулярной биологии, используемый для обнаружения биомолекул, который предполагает проведение реакции на поверхности полимерной мембраны. Обычно используют мембраны, изготовленные из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида, потому что большинство белков эффективно связываются с их поверхностью. Впервые метод дот-блоттинга был описан, вероятно, в 1982 г. — его использовали для анализа связывания различных пар «антиген–антитело» и для обнаружения антител против возбудителей инфекционных заболеваний (цитомегаловируса, аденовируса, микоплазмы и других) в сыворотке крови пациентов [1].

В основе дот-блоттинга лежит последовательность иммунохимических реакций: на подложку (мембрану) наносят рецепторный слой (антитела или антиген), затем отмывают, блокируют и наносят исследуемый образец. При инкубации образца на мембране происходит аффинное связывание анализата с молекулами рецепторного слоя.

Сокращения: ИФА — иммуноферментный анализ, ИЛ16 — интерлейкин-1 бета, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия.

Затем, после повторной отмывки и блокировки, на мембрану наносят антитела против анализата либо их конъюгаты. Часто используют пероксидазу хрена — фермент, работа которого приводит к возникновению колориметрического или хемилюминесцентного сигнала в зависимости от использованного субстрата. В результате окраска мембраны (или хемилюминесценция) наблюдается только в тех местах, где произошло связывание анализата из исследуемого образца.

Отличие дот-блоттинга от традиционного иммуноферментного анализа (ИФА), выполняемого в ячейках планшета, состоит в том, что реакция идет на мембране, а область, в которой происходят все реакции, определяется объемом капель и их растеканием по мембране. Используемый объем раствора может быть снижен до 0.1 мкл [1], хотя на практике обычно используют ~ 5–10 мкл [2, 3]. В современном варианте для нанесения растворов на мембрану часто используют вакуумную систему, которая заставляет раствор двигаться через мембрану под действием перепада давления. Преимущества дот-блоттинга перед обычным ИФА состоят в скорости (мембрану проще отмывать и блокировать, чем планшет), возможности экономии реагентов, а в некоторых случаях — в

возможности проводить регистрацию на качественном уровне без использования ридеров.

Для большинства видов ИФА актуальна задача повышения чувствительности [4, 5]. Она может быть решена за счет использования антител с низкими константами диссоциации, за счет специфических инженерных особенностей или биохимических процедур амплификации сигнала [6]. В некоторых случаях чувствительность может быть улучшена за счет обработки плазмой поверхности полимера-носителя, на котором происходят реакции связывания [7, 8]. При этом улучшение характеристик биосенсора объясняют улучшением смачиваемости полимера-носителя, а также усилением адсорбции молекул рецепторного слоя на его поверхность.

В данной работе мы показали, что чувствительность дот-блоттинга может быть повышена за счет обработки нитроцеллюлозной мембраны в тлеющем разряде. Это было показано на примере иммуносенсора для определения интерлейкина-1 бета (ИЛ1б) — провоспалительного цитокина, имеющего большое клиническое значение [9]. Описываемый иммуносенсор представлял собой «сэндвич» из улавливающих антител, анализата и биотинилированных проявляющих антител, собранный на нитроцеллюлозной мембране. Хемилюминесцентный сигнал, регистрируемый от мембран, обработанных в тлеющем разряде, оказывался интенсивнее, чем аналогичный сигнал от обычной мембраны. Чувствительность анализа (отношение приращения сигнала к приращению концентрации анализата) на обработанных мембранах была почти на порядок выше, чем на необработанных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Использовали мембраны из нитроцеллюлозы с эффективным размером пор 0.45 мкм (Bio-Rad, США). Все основные реагенты для ИФА (улавливающие антитела, ИЛ1б, биотинилированные проявляющие антитела, конъюгаты стрептавидина с пероксидазой хрена) были взяты из набора KSA563hu01 (Cloud-clone, Китай). Для независимого подтверждения используемых концентраций ИЛ1б использовали набор реагентов для определения ИЛ1б (АО «Вектор-Бест», Россия).

Фосфатно-солевой буфер готовили из таблеток («Панэко», Россия). Для приготовления буфера PBST в фосфатно-солевой буфер добавляли 0.075% Tween-20 (Bio-Rad, США). Для блокировки мембран использовали 4%-й раствор бычьего сывороточного альбумина («ПанЭко», Россия); в растворы ИЛ1б добавляли эмбриональную бычью сыворотку, очищенную углем (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США).

Для оценки адсорбции антител на мембраны использовали антивидовые антитела (антитела козы к иммуноглобулину кролика), конъюгированные с красителем Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США). Для растворения нитроцеллюлозных мембран и приготовления пленок методом полива использовали ацетон («Химмед», Россия).

Обработка мембран в тлеющем разряде. Обработку мембран в тлеющем разряде проводили на приборе Emitech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания). Каждую мембрану последовательно обрабатывали с двух сторон, давление составляло 0.1 мбар. Использовали один из двух вариантов обработки: обычный (45 с при силе тока 25 мА) или интенсивный (8 мин при силе тока 50 мА). Обработку мембраны проводили при разной полярности — мембрана была расположена в прианодной или прикатодной области.

Сканирующая электронная микроскопия. Фрагменты мембран размером от 5×5 до 9×9 мм² покрывали слоем золота толщиной 20 нм с помощью распылителя IB3 (Eiko Engineering, Япония). Структуру исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) TM3000 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения Fiji [10].

Инфракрасная спектроскопия. Регистрацию ИК-спектров проводили на ATR-FTIR-спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США) с приставкой MIRacle (PIKE Technologies, США). Для регистрации каждого спектра использовали 30 накоплений, образец прижимали к призме из селенида цинка. Перед измерением каждого образца регистрировали фоновый сигнал.

Иммуноанализ. Иммуноанализ проводили в 24-луночных планшетах, использовали нитроцеллюлозные мембраны размером от 5×5 до 9×9 мм². На мембраны наносили улавливающие антитела в концентрации 10 мкг/мл (использовали объем 10–15 мкл) и выдерживали приблизительно 30 мин с открытой крышкой до высыхания раствора. Затем мембраны блокировали 4%-м раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 40–60 мин при покачивании. После блокировки мембраны отмывали буфером PBST трижды по 5 мин. На подготовленные таким способом мембраны наносили растворы ИЛ1б с известной концентрацией. В качестве разбавителя использовали буфер, состоящий из 0.1% бычьего сывороточного альбумина и 4% эмбриональной бычьей сыворотки в PBST-буфере. Растворы ИЛ1б с рабочей концентрацией в диапазоне 0–280 пг/мл были приготовлены из стокового раствора. Концентрацию стока измеряли с помощью ИФА-набора Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ согласно рекомендациям производителя. Раствор

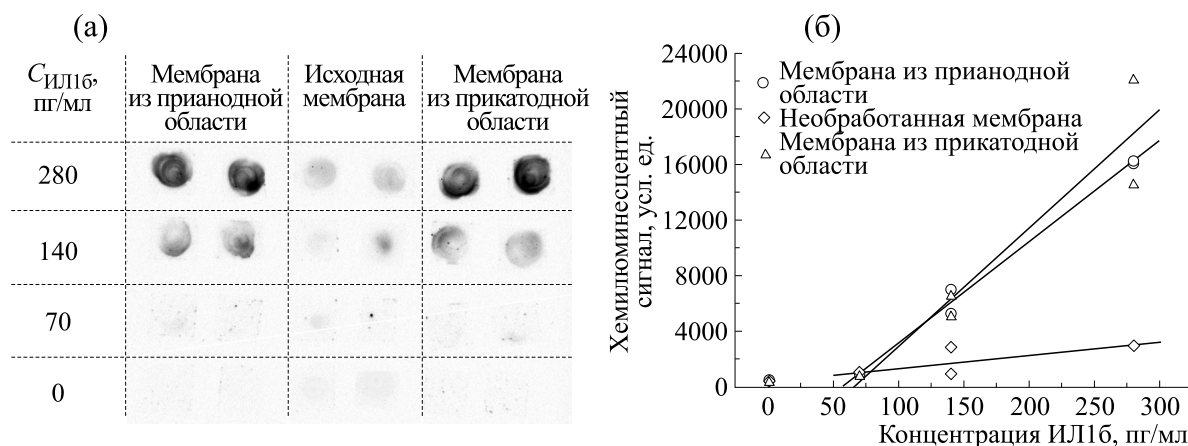


Рис. 1. Результаты измерения концентрации ИЛ16 с помощью дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах: (а) — результаты дот-блоттинга, инвертированное изображение; (б) — зависимости хемилюминесцентного сигнала от концентрации ИЛ16.

ИЛ16 выдерживали на мембранах 60 мин при покачивании, после чего повторяли этап промывки.

Проявляющие биотинилированные антитела разводили до рабочей концентрации 0.5 мкг/мл, наносили на мембраны и инкубировали 60 мин при покачивании, далее повторяли снова этап промывки. На заключительном этапе на мембраны на 30 мин наносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, разведенный в 0.1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина в буфере PBST. Мембраны отмывали в буфере PBST и фосфатно-солевом буфере и вносили хемилюминесцентный субстрат. Съемку проводили на приборе ChemiDoc (Bio-Rad, США) с выдержкой в диапазоне от 5 до 10 мин. Выдержку подбирали так, чтобы был задействован весь динамический диапазон детектора.

Оценка адсорбции антител на мембраны. Измерения методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Мембраны, обработанные растворами флуоресцентно меченых антител, помещали на предметный столик микроскопа, определяли верхнюю и нижнюю поверхности мембраны и фокусировали лазер на равном расстоянии от них для настройки динамического диапазона. Коррекцию настроек по оси z проводили в соответствии с рекомендациями производителя с использованием программного обеспечения NIS-Elements. Изображения получали с помощью объектива CFI Plan Apo VC 20 $\times$ /0.75, параметры съемки (мощность лазера, чувствительность детектора, скорость съемки) были одинаковы для всех образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение чувствительности иммуноферментного анализа. При дот-блоттинге с хемилюминесцентной детекцией на поверхности мембраны наблюдаются светящиеся участки, интенсивность свечения которых монотонно зависит от концентрации аналита в пробе. На рис. 1а представлена фотография мембраны, на которой выполняли дот-блоттинг. Если в эксперименте использовали мембраны, которые были обработаны в тлеющем разряде, то сигнал от них был значительно сильнее, чем сигнал от обычных, необработанных мембран. Этот результат был воспроизведен в трех независимых экспериментах.

Результаты количественной обработки хемилюминесцентных сигналов представлены на рис. 1б. Каждая точка соответствует результатам обработки изображения одного пятна на мембране; все сопоставляемые мембраны были измерены одновременно, поэтому вариации условий съемки полностью исключены. Хотя метод дот-блоттинга обычно используют как полуквантитативный, мы можем построить зависимости сигнала от концентрации (в диапазоне концентраций более 70 пг/мл). Если использовать линейную зависимость, то тангенс угла наклона соответствующего графика будет характеризовать чувствительность анализа — отношение приращения сигнала к приращению концентрации. Для мембран, обработанных в плазме, оно было приблизительно на порядок (в 7.5–9.0 раз) больше, чем для необработанных мембран.

Обнаруженный эффект обладает большой практической значимостью, а также имеет два необычных свойства. Во-первых, он сохранялся в течение как минимум четырех суток после обработки мембран. Другими словами, мембраны, обработанные в тлеющем разряде, после хранения в

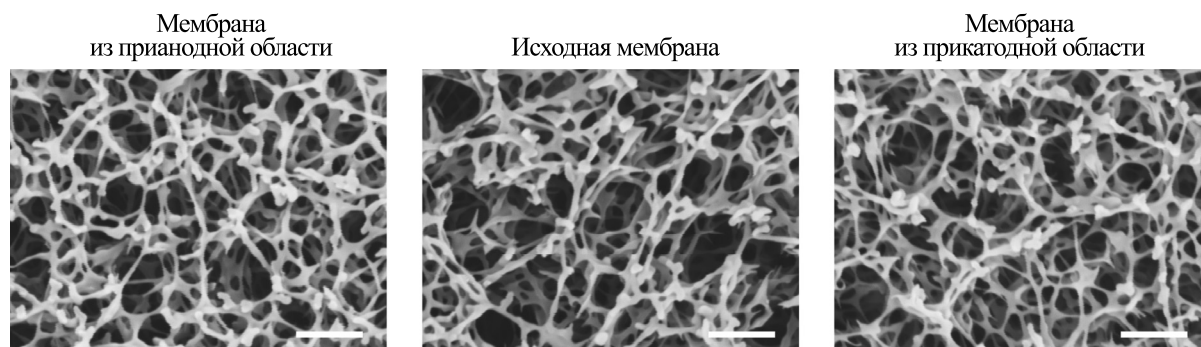


Рис. 2. Изображения нитроцеллюлозных мембран, полученные методом СЭМ. Длина масштабного отрезка — 2 мкм.

течение четырех суток обеспечивали высокий сигнал в эксперименте по дот-блоттингу. Вероятно, время хранения может быть и больше, особенно если хранить мембраны в инертной атмосфере.

Во-вторых, эффект наблюдался независимо от полярности напряжения, использованного при обработке мембраны. На рис. 1 видно, что результаты дот-блоттинга на мембранах, обработанных при разной полярности (мембрана расположена на катоде или на аноде), слабо отличаются друг от друга, но резко отличаются от результатов, полученных на необработанных мембранах. Эта закономерность будет подтверждена ниже в экспериментах по адсорбции флуоресцентно меченых антител на мембраны.

Контроль структуры поверхности мембраны. Изменяется ли поверхность нитроцеллюлозной мембраны при ее обработке в тлеющем разряде? Для ответа на этот вопрос структуру поверхности мембран исследовали методом СЭМ (рис. 2). На изображениях видны поры с характерным диаметром менее 1 мкм, разделенные стенками с толщиной 0.3 ± 0.1 мкм (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Полученные изображения отлично соответствуют литературным данным [11]. Структура мембраны оставалась неизменной при обработке в тлеющем разряде, и совпадала со структурой исходной мембраны. Аналогично, поверхность нитроцеллюлозных мембран не изменялась при автоклавировании [11].

Определение размера пор в мембранах требует дополнительных комментариев. По данным производителя средний размер пор составляет 0.45 мкм и, скорее всего, был определен по результатам теста на начало пузырения (на точку пузырька), который долгое время был стандартом для измерения пористости мембран [12]. В этом тесте через смоченную мембрану пропускают воздух, и измеряют давление P , при котором мембрана начинает пропускать пузыри, а затем по известному давлению вычисляют диаметр пор D по формуле

$$D = K \frac{4\gamma \cos \theta}{P}, \quad (1)$$

где γ — коэффициент поверхностного натяжения жидкости, θ — краевой угол смачивания, K — коэффициент, который зависит от формы пор [13]. Для пор со сложной трехмерной структурой волюмометрические методы измерения обычно более эффективны, чем микроскопия. Поэтому полученные СЭМ-изображения (рис. 2) не противоречат характеристикам мембраны, измеренным производителем.

Чтобы проконтролировать возможные изменения химической структуры мембран после их обработки в тлеющем разряде, использовали метод ИК-спектроскопии. При подготовке образцов для этого исследования использовали два режима — обычный (сила тока 25 мА, время обработки 45 с) и интенсивный (сила тока 50 мА, время обработки 8 мин). «Обычный» режим был выбран потому, что он рутинно используется при подготовке образцов для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии. При этом обрабатывают углеродную поверхность; сетки с углеродным покрытием располагают в прианодной области. Такая обработка усиливает адсорбцию различных объектов, включая внеклеточные везикулы [14], вирусы [15] и ДНК-белковые комплексы [16]. «Интенсивный» режим обработки был использован, чтобы усилить воздействие тлеющего разряда на мембрану и проверить, будет ли изменяться ее ИК-спектр.

Полученные спектры представлены на рис. 3. Видно, что они отлично совпадают (приводятся спектры мембран, обработанных в «интенсивном» режиме — 8 мин при силе тока 50 мА). Нам не удалось зарегистрировать различия, вызванные обработкой мембран в тлеющем разряде. По-видимому, при небольшой мощности (менее ~50 Вт) и небольшом (до 10 мин) времени обработки изменения химической структуры происходят на такой малой глубине, что не обнаруживаются методом ИК-спектроскопии [17]. Аккуратное измерение глубины, на которую

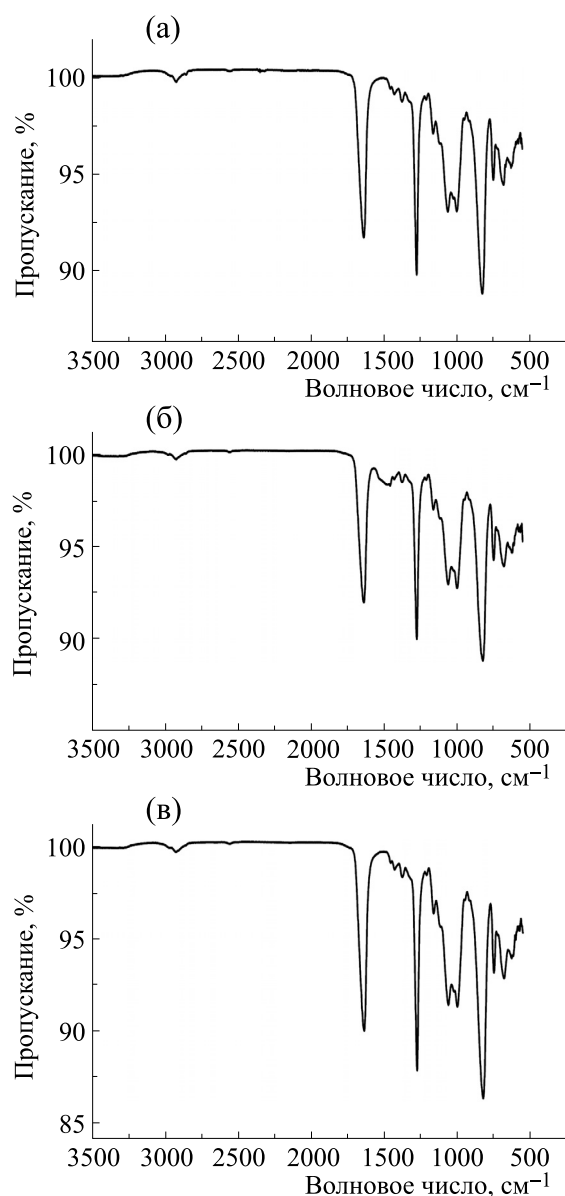


Рис. 3. ИК-спектры нитроцеллюлозы: (а) — необработанная мембрана, (б) — мембрана из прикатодной области, (в) — мембрана из прианодной области.

проникает плазма в пористую мембрану, является нетривиальной задачей и может быть предметом дальнейших исследований.

Расшифровка полос поглощения ИК-спектров представлена в табл. 1. Наиболее заметные полосы соответствуют следующим группам: 1640 см^{-1} — асимметричные валентные колебания групп NO_2 , 1378 см^{-1} — деформационные колебания C—H -связи, 1062 см^{-1} — валентные колебания связи C—O—C в кольце пиранозы, 1000 см^{-1} — валентные колебания C—O , 830 см^{-1} — валентные колебания NO_2 .

Неплотное прилегание образца к призме ИК-спектрометра может быть причиной артефактов. Чтобы исключить влияние пористости на получаемые ИК-спектры, мембраны растворяли в ацетоне и готовили пленки методом полива. Затем поверхность этих пленок обрабатывали в тлеющем разряде и получали ИК-спектры до и после обработки. Положения полос поглощения в спектрах сплошных пленок до и после обработки отлично совпадали, а также совпадали с положениями полос в спектрах пористых мембран (данные не приводятся).

Измерение адсорбции антител на мембраны. Можно предположить, что увеличение сигнала от мембраны, обработанной плазмой, объясняется более интенсивной адсорбцией на нее улавливающих антител. Чтобы проверить эту гипотезу, мы использовали флуоресцентно меченые антитела, наносили их на поверхность мембран, а затем получали изображения мембран с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Изображения всех мембран получали при одних и тех же настройках микроскопа (мощность лазера, чувствительность детектора, скорость съемки и т.п.), чтобы можно было использовать интенсивность флуоресценции как меру интенсивности адсорбции антител на мембрану. Аналогичный подход был использован нами для оценки адсорбции ранее [20], и он применяется многими авторами [7, 8].

На рис. 4 представлены средние значения интенсивностей флуоресценции. От мембран, обработанных в тлеющем разряде, флуоресцентный сигнал был в 15–17 раз интенсивнее, чем от обычных мембран. Это говорит о том, что адсорбция антител на них происходила более интенсивно.

Итак, обработка мембраны в тлеющем разряде сохраняет ее структуру на уровне, доступном исследованию СЭМ, и сохраняет ее химический состав на уровне, доступном ИК-спектроскопии. При этом наблюдается усиленная адсорбция антител на поверхность обработанной мембраны, которая может отчасти объяснять большую чувствительность дот-блоттинга, выполняемого на обработанной мембране. По-видимому, и блокировка мембраны, обработанной в тлеющем разряде, проходит более эффективно, и в общем случае это может положительно отразиться на результатах анализа.

При обработке полимера плазмой происходит множество процессов, включающих формирование свободных радикалов, возникновение новых химических связей, деградацию поверхности и т.д. [21, 22]. При обработке поверхность приобретает электрический заряд, но в описанных выше экспериментах он проявлялся сравнительно слабо. Вероятно, наибольшее влияние на свойства поверхности оказывает ее окисление (обработка

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР

Волновое число, см^{-1}	Функциональная группа и тип колебаний
2918	C–H, вал., сим.
1640	NO_2 , вал., асим.
1378	C–H, деф.
1276	NO_2 , вал., сим.
1062	C–O–C, вал.
1000	C–O, вал.
830	NO_2 , вал.
744	NO_2 , деф.
680	NO_2 , деф.

Примечание. Вал. — валентное колебание, деф. — деформационное колебание, сим. — симметричное колебание, асим. — асимметричное колебание. Интерпретация полос поглощения сделана на основании работ [18, 19].

происходит в кислородной плазме), а также формирование свободных радикалов (оно может обеспечивать высокую адсорбцию).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных данных следует, что обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде увеличивает чувствительность дот-блоттинга. Этот эффект наблюдался вне зависимости от полярности напряжения, использованного при обработке мембраны, и сохранялся в течение, как минимум, четырех дней. Вероятно, увеличе-

ние чувствительности связано с более интенсивной адсорбцией улавливающих антител на обработанную мембрану. Методами СЭМ и ИК-спектроскопии не выявлено изменений в структуре мембран, вызванных обработкой.

Проведенное исследование открывает несколько направлений для дальнейшей работы. Скорее всего, условия обработки поверхности плазмой могут быть оптимизированы для обеспечения наилучшей адсорбции, а также для возможности длительного хранения обработанной поверхности без изменения ее сорбционных свойств. Вероятно, оптимальных результатов можно будет добиться при хранении мембраны в инертной атмосфере. Кроме того, представляет интерес возможность переноса полученных результатов на другие типы лабораторных анализов, например, ИФА, выполняемый в планшетах, или дот-блоттинг на мембранах из поливинилиденфторида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова до 2020 года.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-10042.

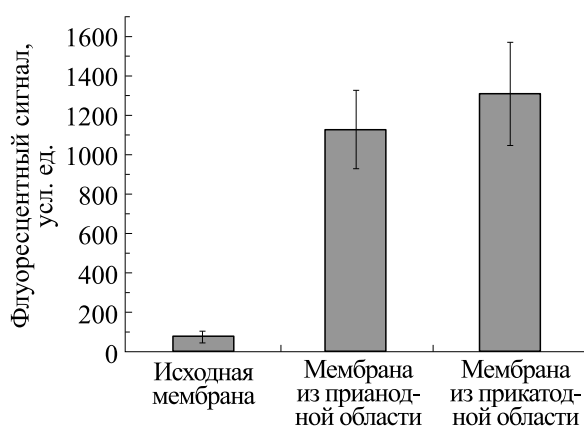


Рис. 4. Результаты измерения флуоресценции мембран с нанесенными на них флуоресцентно мечеными антителами по данным конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

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. R. Hawkes, E. Niday, and J. Gordon, *Anal. Biochem.*, **119** (1), 142 (1982).
2. D. I. Stott, *J. Immunoassay*, **21** (2–3), 273 (2000).
3. V. Faoro and G. Stanta, In *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*, Ed. by G. Stanta (Springer, Berlin, Heidelberg, 2011), pp. 275–276.
4. S. Zhang, et al., *Analyst*, **139** (2), 439 (2014).
5. N. Tsurusawa, J. Chang, M. Namba, et al., *J. Clin. Med.*, **10** (21), 5197 (2021).
6. S. Watabe, H. Kodama, M. Kaneda, et al., *Biophysics (Japan)*, **10**, 49 (2014).
7. J. Wang, et al., *PLoS One*, **8** (12), e82888 (2013).
8. C. F. O. Hoy, et al., *Sensing and Bio-Sensing Research*, **26**, 100304 (2019).
9. N. Kaneko, et al., *Inflamm. Regener.*, **39** (1), 12 (2019).
10. C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nat. Methods*, **9** (7), 671 (2012).
11. A. Li, et al., *Cytotechnology*, **65** (1), 71 (2013).
12. T. H. Meltzer and M. Jornitz, *Am. Pharmaceut. Rev.*, **6**, 44 (2003).
13. Z. Ashrafi, L. Lucia, and W. Krause, *Soft Matter*, **15** (45), 9359 (2019).
14. I. Nikishin, et al., *Micron*, **145**, 103044 (2021).
15. D. V. Bagrov, et al. *Microscopy Res. & Technique*, **85** (2), 562 (2022).
16. O. I. Volokh, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1048117 (2022).
17. J. G. Dillard and I. M. Spinu, *J. Adhesion*, **31** (2–4), 137 (1990).
18. P.-O. Bussiere, J.-L. Gardette, and S. Therias, *Polymer Degradation and Stability*, **107**, 246 (2014).
19. V. I. Kovalenko, et al., *J. Struct. Chem.*, **34** (4), 540 (1994).
20. А. М. Сенковенко и др., *Биофизика*, **67** (3), 555 (2022).
21. О. Йосихито, *Высокомолекуляр. соединения*, **30** (9), 1815 (1988).
22. T. Desmet, et al., *Biomacromolecules*, **10** (9), 2351 (2009).

Glow Discharge Treatment of Nitrocellulose Membranes Increases the Immunoassay Sensitivity

P.A. Petrova*, S.V. Zamalutdinova*, A.A. Vnukova*, D.A. Alekseeva*, and D.V. Bagrov*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

Plasma treatment can make the surfaces of the materials more hydrophilic and improve the surface and adsorption properties. Our research shows that the glow discharge treatment of nitrocellulose membranes improves the adsorption capacity for antibodies by a factor of 15–17 and increases the sensitivity of immunoassay (dot-blotting) performed on the membranes approximatively by an order of magnitude. This feature has been demonstrated for the interleukin-1 beta immunoassay with chemiluminescent detection. Upon glow discharge treatment, the nitrocellulose membranes did not change their structure or chemical composition as can be seen using scanning electron microscopy and IR spectroscopy, respectively. The obtained results can be used to optimize the existing laboratory procedures, especially dot-blotting.

Keywords: nitrocellulose, immunoassay, membrane, sensitivity, antibodies, interleukin