ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2009, том 427, № 1, с. 1–4

БИОФИЗИКА, БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.2.08

УСИЛЕНИЕ СИГНАЛА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НА ГЕЛЕВЫХ БИОЧИПАХ С ЗЕРКАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ ИММУНОАНАЛИЗА

© 2009 г. Ж. И. Зубцова, М. А. Филиппова, Е. Н. Савватеева, Д. А. Зубцов, В. Р. Чечеткин, член-корриспондент РАН Е. В. Гришин, А.С. Заседателев, А. Ю. Рубина

Поступило 21.01.2009 г.

Биологические микрочипы, представляющие собой матрицы M × N элементов, содержащие биологические зонды (ДНК, РНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды, олигосахариды, клетки и т.д.), позволяют проводить параллельный многопараметрический анализ исследуемого образца [1–8]. Иммобилизация зондов производится либо непосредственно на поверхности носителя (2D), такого как стекло, пластик, металл и др. [1–4], либо в объеме трехмерных гелевых ячеек (3D), закрепленных на подложке (рис. 1а, б) [5–8]. Ранее было показано, что использование металлических подложек при изготовлении поверхностных микрочипов может оказывать влияние на интенсивность флуоресценции при проведении анализа, причем в зависимости от ряда факторов, таких как расстояние между флуорофором и металлической поверхностью, условия возбуждения и др., интенсивность флуоресценции может либо увеличиваться, либо уменьшаться [9–13]. Целью данной работы является исследование эффекта усиления флуоресцентного сигнала для трехмерных гидрогелевых микрочипов, нанесенных на подложку с зеркальным металлическим покрытием, и оценка эффективности использования таких микрочипов для количественного иммунофлуоресцентного анализа.

В работе примяняли трехмерные гидрогелевые биочипы, изготовленные по технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А Энгельгардта РАН [5]. Технология изготовления гидрогелевых биочипов основана на полимеризационной иммобилизации молекулярных зондов в ходе формирования гелевых ячеек микрочипа. Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры на основе метакриламида и N-замещенных аминосахаров, 50%-ный глицерин в фосфатно-солевом буфере (0.01 М фосфат натрия, pH 7.2, 0.14 М NaCl), а также подлежащие иммобилизации белки или олигонуклеотиды в виде микрокапель объемом 0.1 нл наносят с помощью робота QArray (“Genetix”, Велико-

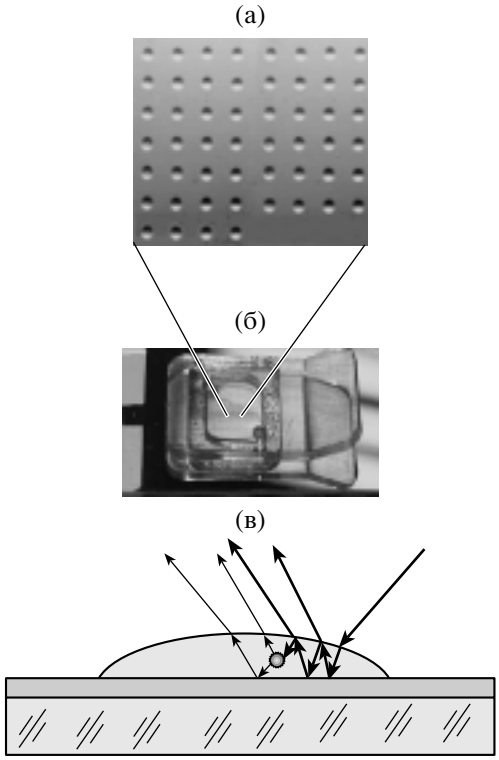

Рис. 1. а – увеличенная фотография микрочипа: каждый гелевый элемент (ячейка) содержит иммобилизованный в объеме геля зонд. б – общий вид микрочипа, изготовленного на металлической подложке. в – схематическое изображение оптических эффектов в гелевой ячейке на зеркальной металлической подложке

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук, Москва
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

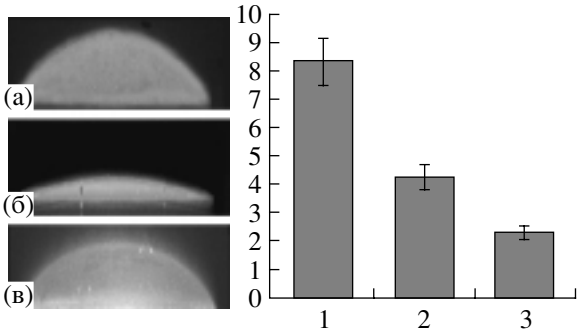

Рис. 2. Изображения гелевых ячеек биочипов, полученные на конфокальном микроскопе. а – набухшая гелевая ячейка после обработки 50%-ным раствором глицерина в фосфатно-солевом буфере (высота ячейки около 50–55 мкм); б – сухая гелевая ячейка (высота 25–30 мкм); в – гелевая ячейка под слоем жидкости (высота 50–55 мкм). Радиусы ячеек составляют 60 мкм. г – относительное усиление флуоресцентного сигнала при изменении формы и окружения ячейки: столбцы 1, 2, 3 соответствуют изображениям а, б и в.

британия) на поверхность подложки (стекло, пластик или металл). Полимеризацию гелевых ячеек проводят под УФ-лампой с максимумом излучения 350 нм (“Sylvania GTE lamp, F15T8/350Bl”, Великобритания) в течение 50 мин при 20°C в токе азота. В качестве металлических подложек в работе использовали подложки Nunc 231644 Microarray с золотым напылением; 25 × 75 мм^2, толщина покрытия 120 нм (“Nunc, Roskilde”, Дания), в качестве прозрачных подложек – стеклянные слайды Corning 2947 Micro Slides (“Corning Glass Works”, США). Флуоресцентный краситель – Cy5 (“Amersham Pharmacia Biosciences”, США): длины волн поглощения/испускания 650/670 нм. Для проведения экспериментов по оценке усиления интенсивности флуоресценции было изготовлено несколько серий биочипов, в которых гелевые ячейки, содержащие гелеобразующие мономеры и молекулярные зонды одинакового состава, были нанесены на прозрачную стеклянную и на зеркальную металлизированную подложки.

Влияние формы ячеек и переотражения излучения от внешней границы гелевых элементов. Гелевые ячейки микрочипа после завершения полимеризации отмывают от непрореагировавших гелеобразующих компонентов и глицерина, который препятствует высыханию ячеек в ходе изготовления микрочипа. При исследовании эффекта усиления флуоресценции для микрочипов, изготовленных на зеркальной подложке по сравнению с микрочипами, нанесенными на прозрачное стекло, нами было обнаружено, что после процедуры отмывки и высушивания эффект усиления существенно снижается. Мы предположили, что одним из факторов, влияющих на разницу в увеличении флуоресценции, является форма гелевой ячейки, которая изменяется в результате отмывки и высушивания.

Исследования формы гелевых ячеек и их размеров на конфокальном микроскопе (λ = 548 нм; “Leica TCS”, Германия) показали, что ячейки после завершения полимеризации имеют форму, близкую к полусферической, в то время как отмытые сухие ячейки имеют уплощенную форму с уменьшением высоты ячейки примерно в два раза (рис. 2а, б). При обработке высушенных ячеек биочипа водным раствором глицерина с последующим удалением избытка раствора в токе воздуха происходит возврат к полусферической форме ячеек, которая сохраняется длительное время за счет глицерина, проникшего в объем гелевой ячейки (рис. 2а). Высушенные ячейки биочипа, помещенные под слой буферного раствора также приобретают полусферическую форму (рис. 2в).

Относительное усиление сигнала (r) для ячеек на микрочипах с зеркальной подложкой при изменении формы и окружения ячейки составило: для ячеек с полусферической формой (рис. 2а) в отсутствие буферного раствора $r \sim 7.5$–8.5 раз, для сухих ячеек с плоской формой (рис. 2б) $r \sim 4$–5 раз. В то же время наличие слоя жидкости над ячейкой (рис. 2в) существенно уменьшает усиление до $r \sim 2.5$–3 раз, несмотря на полусферическую форму ячейки. В дополнение к водному буферному раствору с показателем преломления $n_b = 1.33$ и относительным усилением $r \approx 2.5$ были исследованы также другие жидкости, для которых определен коэффициент усиления r: глицерин ($n_b = 1.43$; $r \approx 2.6$), бензол ($n_b = 1.5$; $r \approx 2.5$), минеральное масло ($n_b = 1.52$; $r \approx 2.3$) и нафталин ($n_b = 1.66$; $r \approx 2.5$). Как видно из приведенных данных, зависимости коэффициента усиления для жидкостей с различным показателем преломления не наблюдается.

Считается, что причиной усиления флуоресценции для биочипов с зондами, иммобилизованными непосредственно на металлической подложке (2D), является взаимодействие флуорофора с металлом по плазмонному механизму [9, 11]. Для гелевых биочипов наблюдаемые эффекты усиления можно объяснить посредством геометрической оптики. Поскольку отражение излучения от металла дает усиление как возбуждающего излучения от источника света, так и самого излучения от флуорофора примерно в 2 раза получаем результирующее усиление флуоресценции ~4 раза, что соответствует экспериментальным данным для сухих ячеек. Влияние внутреннего отражения излучения флуоресценции для ячеек с плоской формой приводит к тому, что почти половина излучения рассеивается в торцы ячеек и не попадает в объектив микроскопа. В полусферических ячейках на металлизированных подложках уход излучения в торцы существенно

ниже, что приводит к дополнительному удвоению выхода излучения из ячейки, таким образом получаем результирующее усиление флуоресценции в ~8 раз. Для биочипов под слоем жидкости исчезает граница раздела фаз гель – воздух (для геля $n_b = 1.4$), и вследствие этого подавляется эффект внутреннего отражения. В этих условиях коэффициент усиления для ячеек под слоем жидкости ниже четырех и может достигать величин ~2.5–3 раза. Таким образом, в усилении излучения флуоресценции для гелевых биочипов определяющую роль играют отражение излучения от зеркальной поверхности металла и переотражения на границе гелевая ячейка–воздух, т.е. данный эффект объясняется геометрической оптики.

Нами была проведена оценка возможности использования усиления флуоресценции на микрочипах с металлизированной поверхностью для оптимизации процедуры анализа. В экспериментах оценивали сигналы, получаемые при проведении различных вариантов иммуноанализа с образованием в ячейках биочипов бинарных, тройных или четырехкомпонентных комплексов, а также, сигналы от ячеек с иммобилизованным флуоресцентно-меченным белком или олигонуклеотидом. Полученные величины относительного усиления интенсивности флуоресценции на гелевых биочипах с металлизированной подложкой по сравнению с аналогичными биочипами, изготовленными на стеклянной подложке, приведены на рис. 3. Как видно из рисунка, металлическое покрытие дает 4–5-кратное увеличение флуоресцентного сигнала вне зависимости от типа иммунокомплекса или природы иммобилизуемого зонда. Таким образом, усиление флуоресценции на отражающих металлических подложках может быть использовано для оптимизации процедуры анализа на биочипах, содержащих различные иммобилизованные зонды и различные типы комплексов.

Оптимизация процедуры иммуноанализа биотоксинов. Оценку эффективности использования гидрогелевых микрочипов, изготовленных на металлической подложке, проводили на примере сэндвич-иммуноанализа рицина. При проведении иммуноанализа на микрочип с иммобилизованными антителами против рицина наносили смесь, содержащую определяемый токсин и проявляющие биотинилированные антитела, и инкубировали при 37°С. После этого микрочипы отмывали и обрабатывали флуоресцентно-меченным стрептавидином. После завершения анализа с помощью разработанного в ИМБ РАН анализатора биочипов [14], снабженного специальным программным обеспечением, регистрировали и обсчитывали флуоресцентные сигналы. Неизвестную концентрацию токсина в образце определяли по калибровочной кривой - графику зависимости ин-

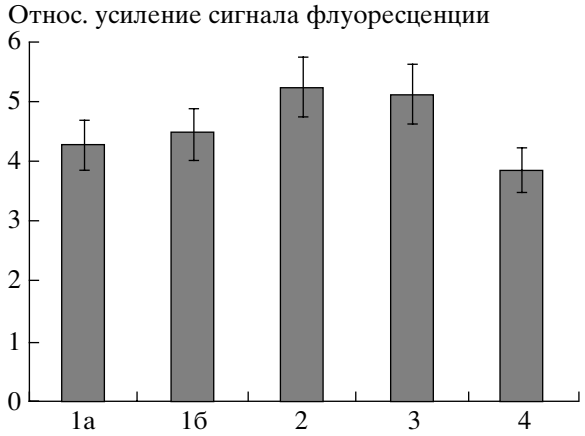

Рис. 3. Относительное усиление флуоресцентного сигнала для различных типов взаимодействий на биочипе: 1а – иммобилизованный флуоресцентно-меченный белок; 1б – иммобилизованный флуоресцентно-меченный олигонуклеотид; 2 – бинарный комплекс: иммобилизованный антиген–флуоресцентно-меченное антитело; 3 – тройной комплекс иммобилизованное антитело–антиген–флуоресцентно-меченное антитело); 4 - четырехкомпонентный комплекс: иммобилизованное антитело–антиге –конъюгат антител с биотином–флуоресцентно-меченный стрептавидин.

тенсивности флуоресцентного сигнала от известных концентраций рицина в растворе.

Одной из основных характеристик количественного иммуноанализа является его чувствительность – наименьшая достоверно определяемая концентрация антигена, на которую влияют две группы факторов: константы ассоциации используемых для анализа антител с исследуемыми антигенами и уровни регистрируемых сигналов, определяющие угол наклона калибровочной кривой. Для оценки влияния эффекта усиления флуоресценции на чувствительность анализа были получены калибровочные кривые на биочипах, изготовленных на металлической и стеклянной подложках (рис. 4а). Как видно из рисунка, при равных условиях проведения анализа превышение уровней сигналов для всех концентраций антигена, получаемых на металлизированных подложках, составляет 3.7–4.2 раза, при этом чувствительность анализа рицина при трехчасовой инкубации образца на биочипах, изготовленных на металле и стекле, составила 0.05 и 0.3 нг/мл соответственно.

Другая возможность оптимизации анализа при использовании эффекта усиления флуоресценции состоит в сокращении времени анализа, что особенно важно при определении таких антигенов, как биотоксины. В приведенном протоколе анализа лимитирующей по времени является стадия образования на биочипе тройных комплексов: иммобилизованное антитело – антиген – биотинилированное антитело. Ранее для биочипов,

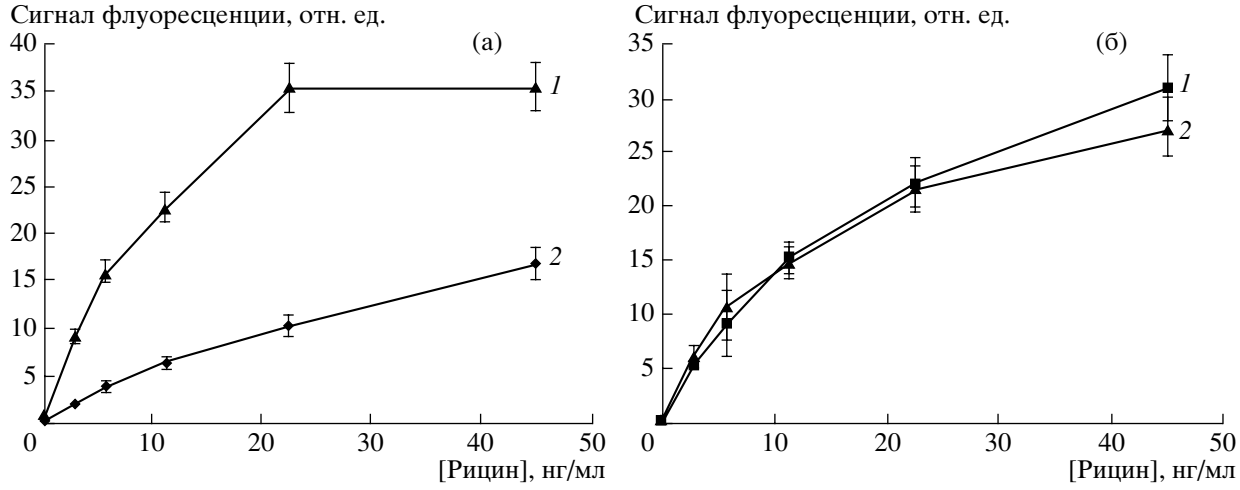

Рис. 4. Калибровочные кривые сэндвич-иммуноанализа рицина, полученные на биочипах на стеклянной подложке (*1*) и подложке с металлическим напылением (*2*). а – время иммуноанализа составляло 3 ч в обоих случаях (значение сигнала для верхней точки на кривой *1* находится за пределом динамического диапазона измерений прибора); б – в случае 1 – время иммуноанализа составляло 17 ч, во 2 – 1 ч. Каждая точка калибровочной кривой – среднее значение из измерений на трех биочипах. Вертикальными отрезками показаны величины стандартных отклонений.

изготовленных на стеклянной подложке, нами было подобрано время инкубации 17 ч, исходя из уровней сигналов, обеспечивающих необходимую чувствительность анализа токсинов [15]. Оказалось, что тех же уровней сигналов и той же чувствительности (0.1 нг/мл) для анализа рицина на биочипах с металлизированной подложкой можно достичь при инкубации образца с проявляющими антителами в течение одного часа (рис. 4б).

Таким образом, применение металлизированных подложек позволяет значительно повысить чувствительность иммуноанализа рицина, что дает возможность сократить время анализа в 17 раз.

Сочетание универсальности эффекта усиления флуоресценции на подложках с металлическим напылением с технологией гидрогелевых биочипов, позволяющей создавать биочипы, содержащие молекулярные зонды различной природы (ДНК, РНК, белки, олигосахариды) [7, 8], позволит оптимизировать протоколы проведения анализа независимо от типа анализа (гибридизация ДНК, белок – белковые взаимодействия и др.) и будет способствовать дальнейшему развитию технологии микрочипов.

Авторы благодарят С.В. Панькова и Э.Я. Крейдлина и группу производства за помощь в производстве микрочипов, И.В. Гречишникову и С.В. Суржикова за синтез олигонуклеотидов, а также А.А. Стомахина за критическое обсуждение экспериментов и их результатов.

Работа частично поддержана Государственным контрактом № ГП/07/538/НТБ/К от 11.09.2007 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Angenendt P.* // Drug Discov. Today. 2005. V. 10. P. 503–511.
2. *Chen C.-S., Zhu H.* // BioTechniques. 2006. V. 40. P. 423–429.
3. *Stoughton R.B.* // Annu. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 53–82.
4. *Pollack J.R.* // Amer. J. Pathol. 2007. V. 171. P. 375–385.
5. *Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В.* Пат. РФ № 2216547 // Бюл. изобр. 2003. № 32.
6. *Rubina A.Yu., Kolchinsky A., Makarov A.A., Zasedatelev A.S.* // Proteomics. 2008. V. 8. P. 817–831.
7. *Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I. et al.* // Anal. Biochem. 2004. V. 325. P. 92–106.
8. *Rubina A.Yu., Dementieva E.I., Stomakhin A.A.* // BioTechniques. 2003. V. 34. P. 1008–1022.
9. *Aslan K., Gryczynski I., Malicka J. et al.* Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 55–62.
10. *Sauer U., Preininger C., Krumpel G.* // Sensors and Actuators. 2005. B. V. 107. P. 178–183.
11. *Lakowicz J.R.* // Anal. Biochem. 2005. V. 337. P. 171–194
12. *Sabanayagam C.R., Lakowicz J.R.* // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35.P. e13.
13. *Strohsahl C.M., Miller B.L., Krauss T.D.* // Nature Protocols. 2007. V. 2. P. 2105–2110.
14. *Barsky V., Perov A., Tokalov S.* // J. Biomol. Screening. 2002. V. 7. P. 247–257.
15. *Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I. et al.* Anal. Biochem. 2005. V. 340. P. 317–329.