

НАНОЗИМЫ НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ И ИММУНОАНАЛИЗ

М.Д. Кропанева¹, П.В. Храпцов^{1,2}, М.Б. Раев^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день ключевым методом лабораторной диагностики является иммуноферментный анализ (ИФА). В качестве детектирующих реагентов в ИФА применяются конъюгаты ферментов с распознающими молекулами. Чаще всего роль цветной метки в таких конъюгатах играет фермент пероксидаза хрена, что сопряжено с рядом проблем: высокая стоимость, трудоемкость технологии выделения и низкий выход, чувствительность фермента к физико-химическим факторам среды, снижение ферментативной активности в присутствии некоторых консервантов [1, 2]. Решением описанных трудностей может стать использование нанозимов, а именно нанозимов берлинской лазури, в качестве альтернативы пероксидазе хрена. Данные нанозимы способны превращать в окрашенный продукт те же хромогенные субстраты, но обладают большей устойчивостью, а метод их получения является менее трудоемким и более дешевым [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Таким образом на основе нанозимов берлинской лазури могут быть разработаны диагностические реагенты для различных форматов иммуноанализа (ИФА-подобного, дот-иммуноанализа, иммунохроматографии).

Традиционным методом синтеза нанозимов берлинской лазури считается смешивание солей железа с разной валентностью. Недостатком данного подхода является низкая каталитическая активность получаемых нанозимов по сравнению с пероксидазой хрена [9]. Российскими учеными был предложен метод синтеза на основе восстановления перекисью водорода смеси солей трехвалентного железа: FeCl_3 и $\text{K}_3\text{FeC}_6\text{N}_6$ [10]. Нанозимы берлинской лазури, синтезированные согласно описанному методу, обладают более высокой каталитической активностью в сравнении с пероксидазой хрена и нанозимами, получаемыми по традиционной методике [10]. Описанная технология является многообещающей и может быть успешно использована при создании диагностических реагентов для иммуноанализа в различных форматах, однако технологические аспекты синтеза нанозимов берлинской лазури новым методом малоизучены.

Цель работы – изучение параметров, влияющих на ход синтеза высокоактивных нанозимов берлинской лазури, а также разработка методик, позволяющих получать стабильные нанозимы различного размера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нанозимы берлинской лазури получали с помощью копреципитационного синтеза. В воду последовательно добавляли 0.1 М раствор FeCl_3 и 0.1М раствор $\text{K}_3\text{FeC}_6\text{N}_6$ до их конечной концентрации 3.125 мМ при интенсивном перемешивании. Образование берлинской лазури инициировали путем добавления H_2O_2 до конечной концентрации 22 мМ. Контроль температуры производился при помощи термодатчика. Длительность реакции составляла от 60 до 150 минут в зависимости от целей эксперимента. По окончании синтеза нанозимы осаждали и отмывали водой при помощи центрифугирования, 15000–20000g. Затем нанозимы ресуспендировали в воде при помощи ультразвуковой обработки. Оставшиеся в образцах агрегаты удаляли центрифугированием на малой скорости, до 1600g.

В процессе синтеза оценивали следующие параметры: изменение рН среды, оптическую плотность растворов, размеры и дзета-потенциал формирующихся нанозимов.

Функциональную активность конъюгатов нанозимов берлинской лазури со стрептавидином оценивали с помощью твердофазного дот-иммуноанализа. В качестве твердой фазы была использована нитроцеллюлозная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм. На смоченную мембрану наносили точками по 2 мкл растворы, содержащие биотинилированный БСА (Bi-БСА) и БСА (отрицательный контроль), с концентрацией 100 мкг/мл и менее.

После высушивания и промывки проводили процедуру блокирования неспецифических сайтов связывания фосфатным буфером с твином-20, БСА и казеином. Затем тест-полоски промывали и помещали в растворы детектирующих реагентов на основе конъюгатов нанозимов берлинской лазури со стрептавидином в блокирующем буфере. После этапа промывки вносили субстрат – раствор диаминобензидина в Трис-HCl буфере. Результат оценивали визуально.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено влияние температуры на ход синтеза. Показано, что проведение синтеза при +30 °C приводит к формированию нанозимов со средним диаметром 100 нм, в то время как проведение реакции при +60 °C – нанозимов в районе 150 нм (рис. 1).

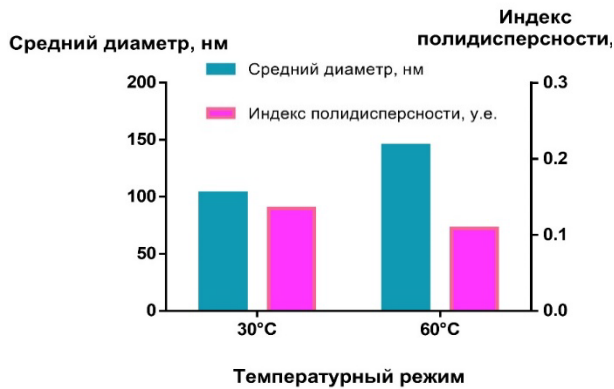


Рисунок 1. Результат оценки влияния температурного режима на размеры получаемых нанозимов берлинской лазури

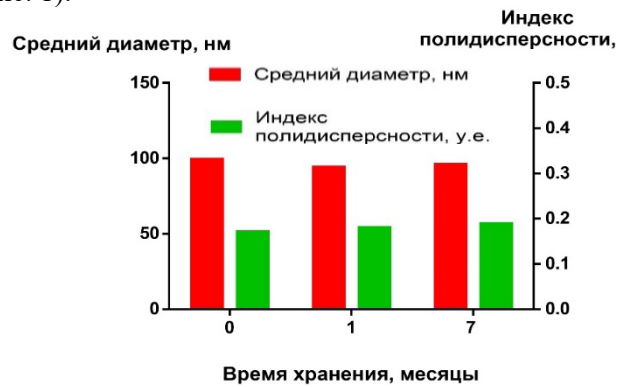


Рисунок 3. Коллоидная стабильность нанозимов берлинской лазури при хранении



Рисунок 2. Результат оценки влияния концентрации А) лимонной и Б) щавелевой кислот на размер получаемых нанозимов берлинской лазури

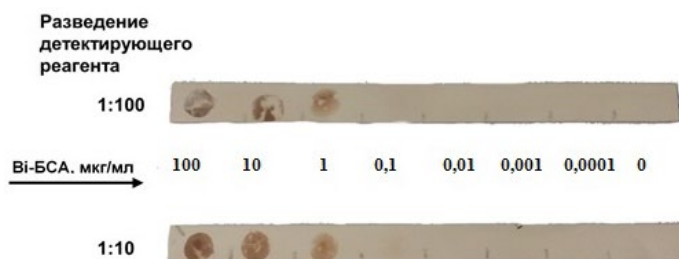


Рисунок 4. Результат иммуноанализа с применением детектирующих реагентов на основе нанозимов берлинской лазури

Изучено влияние концентрации лимонной и щавелевой кислот на ход синтеза. Изменение концентрации данных кислот позволяет управлять размерами формирующихся нанозимов (рис. 2). Разработка методик, позволяющих получать нанозимы с регулируемыми размерами, играет большую роль при создании диагностических тест-систем.

Размер нанозимов влияет на уровень сорбции распознающих элементов (за счет изменения площади удельной поверхности), а также на их пероксидазоподобную активность [2, 11]. Следовательно, управление размерами получаемых нанозимов позволяет регулировать работу конъюгатов на их основе в качестве диагностических реагентов в иммуноанализе.

Проведена оценка коллоидной стабильности полученных нанозимов при хранении в условиях комнатной температуры в течении 7 месяцев (рис. 3). Сведения о стабильности суспензий нанозимов, сроках и условиях хранения являются важными, так как эти параметры в конечном итоге определяют успех их применения.

Проведена оценка работы конъюгатов нанозимов берлинской лазури со стрептавидином в качестве детектирующих реагентов для твердофазного иммуноанализа (рис. 4).

Таким образом, разработаны методы синтеза высокоактивных нанозимов берлинской лазури, позволяющие получать стабильные суспензии с регулируемыми размерами. Также показана применимость конъюгатов нанозимов берлинской лазури в иммуноанализе.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда
(проект № 20–75–00029)*

ЛИТЕРАТУРА

1. Attar F. et al. Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities // Journal of Molecular Liquids. 2018. V. 278. P.130–144.
2. Huang Y., Ren J., Qu X. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications // Chemical Reviews. 2019. V. 119. № 6, P. 4357–4412.
3. Wang W., Gunasekaran S. Nanozymes-based biosensors for food quality and safety // TrAC. 2020, V. 126. № 115841.
4. Vokhmyanina D.V. et al. ‘Artificial peroxidase’ nanozyme – enzyme based lactate biosensor // Talanta. 2020. V. 208. № 120393.
5. Yang Z. et al. Smart CuS Nanoparticles as Peroxidase Mimetics for the Design of Novel Label-Free Chemiluminescent Immunoassay. // ACS Applied Materials and Interfaces. 2016. V.8. № 19. P. 12031–12038.
6. Wan Y. et al. Manganese oxide nanowire-mediated enzyme-linked immunosorbent assay. // Biosensors and Bioelectronics. 2012. V. 33. № 1., P. 69–74.
7. Fan K. et al. In vivo guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy. // Nature Communications. 2018. V. 9 (1). № 1440.
8. Zhang. T. et al. Enhanced peroxidase activity and tumour tissue visualization by cobalt-doped magnetoferritin nanoparticles // Nanotechnology. 2017. V. 28 (4), № 045704.
9. Liu. X. et al. Peroxidase-Like Activity of Smart Nanomaterials and Their Advanced Application in Colorimetric Glucose Biosensors. // Small. 2019. V.5 (17). № 1900133.
10. Komkova. M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // Journal of the American Chemical Society. 2018. V. 140. № 36. P. 11302–11307.
11. Sapsford K.E. et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology // Chemical Reviews. 2013. V. 113. № 3, P. 1904–2074.