

УДК 57.083.3; 577.112; 615.07

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ БЕЛКА, СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Е.А. Яковлева, И.П. Андреева, В.Г. Григоренко, А.П. Осипов

(кафедра химической энзимологии; e-mail: yakovlevahelena@gmail.com)

Разработан метод иммунохроматографического анализа для экспресс-определения белка, связывающего жирные кислоты (с-БСЖК), – нового раннего маркера острого инфаркта миокарда. В качестве визуальной метки использованы наночастицы золота. Определены оптимальные условия проведения анализа. Предел обнаружения метода составил 1,5 нг/мл, коэффициент вариации не превышал 8%. С помощью разработанной тест-системы был подтвержден клинически установленный диагноз острого инфаркта миокарда ($N = 10$), в сыворотках крови здоровых людей ($N = 25$) результат теста был отрицательным.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ; острый инфаркт миокарда; белок, связывающий жирные кислоты.

Своевременная диагностика острого инфаркта миокарда (ОИМ) – одна из актуальных проблем современной кардиологии. Многочисленными исследованиями установлено, что раннее начало терапии при подтвержденном диагнозе ОИМ позволяет уменьшить летальность как в первые часы, так и в более поздние сроки пребывания больного в стационаре.

Развитие ОИМ сопровождается обширным разрушением кардиомиоцитов и как следствие большим выбросом в кровь специфичных для миокарда белков. Белок, связывающий жирные кислоты (с-БСЖК, 15 кДа), является представителем семейства внутриклеточных липид-связывающих белков, участвующих в метаболизме жирных кислот, и в большом количестве содержится в сердечных мышцах (0,56 мг/г сердечной ткани). В крови здоровых людей уровень с-БСЖК не превышает 6–8 нг/мл [1, 2]. Было показано, что при повреждении миокарда концентрация с-БСЖК в крови, подобно миоглобину, значительно (в 10 и более раз) повышается в течение 3 ч после появления симптомов ОИМ и возвращается к нормальному уровню через 12–24 ч [3]. Этот факт, а также хорошая тканеспецифичность в сравнении с миоглобином, делают с-БСЖК перспективным маркером ранней диагностики ОИМ.

В настоящее время существуют как количественные [4, 5], так и качественные [6, 7] методы определения концентрации с-БСЖК в плазме (сыворотке) крови или моче пациента, в основе которых лежат иммунохимические методы анализа. Ранее в нашей лаборатории был разработан метод твердофазного

конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания с-БСЖК в сыворотке крови [8], предел обнаружения метода составил 1,5 нг/мл. Недостаток данного метода – длительное время анализа (1,5–2,0 ч), что не позволяет осуществлять экспресс-определение с-БСЖК в первые часы заболевания.

В последние годы в медицинской практике для быстрого выявления биологически активных соединений и диагностики многих заболеваний нашли широкое применение методы визуального иммунохроматографического анализа (ИХА), которые характеризуются коротким временем анализа (10–15 мин), простой и доступной процедурой определения, не требующей дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала.

Настоящая работа посвящена созданию иммунохроматографической тест-системы для определения белка, связывающего жирные кислоты, с целью раннего выявления ОИМ.

Экспериментальная часть

В работе использованы золотохлористоводородная кислота (ЗХВК) («Fluka», Швейцария); бычий сывороточный альбумин (БСА), цитрат натрия, индикаторные рН-полоски, биохимические и химические реагенты фирмы «Sigma» (США); неорганические соли марки «ос.ч.» («Химмед», Россия). Моноклональные антитела к с-БСЖК двух видов (МАт<9F3>, МАт<10E1>), поликлональные антитела к с-БСЖК двух видов (ПАт<К-5>, ПАт<К-10>) и антивидовые

антитела овцы против IgG мыши были предоставлены ЗАО «НВО Иммунотех». В мультимембранных тест-полосках для иммунохроматографии были использованы мембраны фирмы «MDI» (Индия).

Использовали следующие буферные растворы: 0,01 М К-фосфатный, pH 7,0 (ФБ); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, pH 7,2–7,4 (ФБС); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,1% твин 20, pH 7,4 (ФБСТ). Стандартные растворы с-БСЖК для анализа с концентрациями 0; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 нг/мл готовили в ФБСТ или сыворотке крови, не содержащей с-БСЖК, из исходного раствора с-БСЖК (10000 нг/мл в ФБС). Образцы сывороток крови были предоставлены клиническими больницами № 50 и № 67 г. Москвы.

Получение коллоидного золота. Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали по методу Френса [9]. В колбу с магнитной мешалкой добавляли 99 мл бидистиллированной воды и 1 мл 1%-го раствора ЗХВК. Раствор нагревали до кипения, после чего быстро при перемешивании добавляли 2 мл 1%-го водного раствора цитрата натрия. Раствор кипятили еще 15 мин при перемешивании, затем охлаждали до комнатной температуры в темном месте. Средний размер полученных наночастиц составил 20 нм по данным сканирующей электронной микроскопии.

Определение оптимальных условий сорбции антител на наночастицах золота. Оптимизацию проводили на 96-луночном полистироловом планшете («Greiner», Австрия). На планшете выбирали 8 рядов по 6 лунок в каждом. Каждый ряд соответствовал фиксированному значению pH, а каждый столбец – определенной концентрации антител.

В аликвотах (по 2,5 мл) суспензии коллоидного золота значения pH варьировали с шагом 0,5 в диапазоне от 5,5 до 9,0, добавляя 0,1 М раствор карбоната натрия. В лунки планшета вносили по 200 мкл растворов коллоидного золота с соответствующими значениями pH и по 20 мкл растворов антител с концентрацией 0, 30, 60, 120, 180, 360 мкг/мл в деионизованной воде. Планшет инкубировали 15 мин при перемешивании и добавляли по 50 мкл 10%-го раствора хлорида натрия. Измеряли оптическое поглощение в лунках планшета на длинах волн 520 и 580 нм.

Приготовление конъюгата наночастиц золота с антителами. К 10 мл раствора коллоидного золота с pH 7,0–7,5 добавляли по каплям при перемешивании 1 мл раствора антител с выбранной концентрацией, перемешивали в течение 30 мин при комнатной

температуре. Затем к полученному раствору добавляли БСА (до конечной концентрации 0,1%), сахарозу (до конечной концентрации 10%) и 0,01% азида натрия. Полученный конъюгат хранили при температуре +4°C.

Для удаления несвязавшихся антител конъюгат центрифугировали (20 мин, 11000g, 4°C). Супернатант удаляли, осадок перерастворяли в требуемом объеме ФБ, содержащем 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия. Измеряли спектр поглощения и полученный раствор наносили на полоску стекловолоконной мембраны 4×4 мм из расчета 10 мкл на полоску с $A_{520} = 2$ опт. ед.

Получение иммунохроматографического компонента. На аналитическую нитроцеллюлозную мембрану наносили раствор специфических антител в ФБС с помощью программируемого автоматического диспенсера «BioDot XYZ 3050» («BioJet Quanti 3000», «BioDot», США) для формирования аналитической зоны. Для формирования контрольной зоны иммунохроматографической системы на расстоянии 5 мм от аналитической зоны наносили раствор аффинно очищенных антивидовых антител овцы против мыши с концентрацией 1 мкг/мл. Использовали следующие параметры насоса «BioJet Quanti 3000» для нанесения образцов: размер капли – 30 нл, шаг – 0,3 мм, скорость – 50 мм/с. Полоски высушивали при температуре 37°C (относительная влажность 25–30%) в течение 24 ч и хранили при комнатной температуре в герметично закрытой упаковке.

Растворы конъюгатов антител с наночастицами коллоидного золота наносили на мембраны РТ-5 и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Собирали тест-полоски в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.

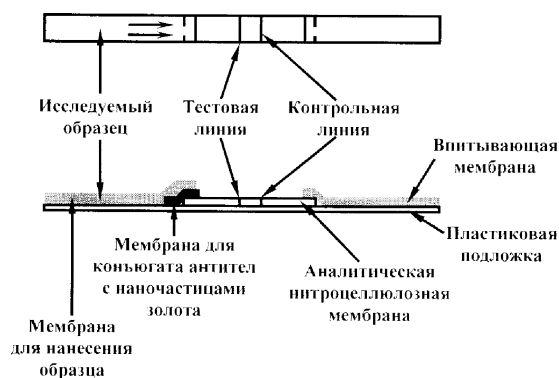


Рис. 1. Схема тест-полоски

Проведение иммунохроматографического анализа. Готовые тест-полоски вертикально помещали в лунки полистиролового планшета для ИФА либо со 180 мкл стандартных растворов с-БСЖК в ФБСТ, либо со 180 мкл растворов анализируемых сывороток крови, предварительно разбавленных в 5 раз ФБСТ. Через 15 мин тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность и высушивали.

Для количественной оценки результатов анализа тест-полоски сканировали на планшетном сканере «Epson Perfection V700 Photo» («Seiko-Epson», Япония), полученные в виде графических файлов (tif) изображения обрабатывали с помощью программы «Scion Image», определяли интенсивность окраски полос в аналитической зоне (в виде условных единиц) и строили градуировочные графики зависимости интенсивности полос от концентраций стандартных растворов с-БСЖК.

Предел обнаружения метода (нг/мл) рассчитывали как концентрацию с-БСЖК, соответствующую двум условным единицам интенсивности сигнала.

Результаты и обсуждение

Иммунохроматографический анализ основан на взаимодействии определяемого антигена (с-БСЖК) с антителами, в качестве визуального детектирующего агента используются наночастицы золота, обладающие способностью поглощать свет в видимой области спектра. Тест-полоска для проведения ИХА представляет собой подложку, на которую последовательно наклеены мембраны (рис. 1), вдоль которых движется поток жидкости, содержащий анализируемый образец.

При нанесении образца на специальную мембрану начинается его движение вдоль полоски под действием капиллярных сил. В присутствии определяемого антигена в образце происходит образование комплекса антигена с мечеными наночастицами золота специфическими антителами, сорбированными на стекловолочной мембране. Далее в тестовой зоне происходит связывание образовавшегося иммунокомплекса иммобилизованными в виде узкой линии специфическими антителами и наблюдается появление окрашенной полосы, интенсивность которой пропорциональна содержанию анализируемого вещества в образце. Избыток несвязавшихся меченых антител мигрирует далее к контрольной зоне, где иммобилизованы антигенные антитела, и образуется вторая окрашенная линия. При отсутствии в исследуемом образце с-БСЖК меченные золотом антитела задерживаются лишь

вторичными антителами в контрольной зоне. Таким образом, наличие видимой окраски в контрольной зоне в обоих случаях свидетельствует о работоспособности теста.

В настоящей работе для исследования были доступны два вида поликлональных антител (ПАт<K5>, ПАт<K10>) и два вида моноклональных антител (МАт<9F3>, МАт<10E1>), специфичных к с-БСЖК. В первую очередь необходимо было подобрать оптимальные условия (минимальная стабилизирующая концентрация и pH сорбции) для получения стабильных меченных наночастицами золота антител, способных эффективно взаимодействовать с с-БСЖК. Были приготовлены серии растворов коллоидного золота с различными значениями pH (от 5,5 до 9,0), к которым добавляли различные концентрации специфических антител (от 0 до 30 мкг/мл). При увеличении ионной силы добавлением хлорида натрия происходила агрегация нестабилизированных наночастиц золота, что сопровождалось изменением цвета раствора с красного до серо-синего, вплоть до бесцветного. Для стабилизированных наночастиц золота характерный пик плазмонного резонанса находится в районе 520 нм. Поэтому для определения количественного эффекта стабилизации вычисляли разность оптических поглощений раствора при длинах волн 520 и 580 нм ($A_{520} - A_{580}$).

На рис. 2 представлены полученные данные для моноклональных антител МАт<10E1>, специфичных к с-БСЖК. Для антител ПАт<K5>, ПАт<K10> и МАт<9F3> были получены аналогичные результаты. Следует отметить, что с увеличением концентрации антител влияние pH, начиная с 7,5, на стабилизацию

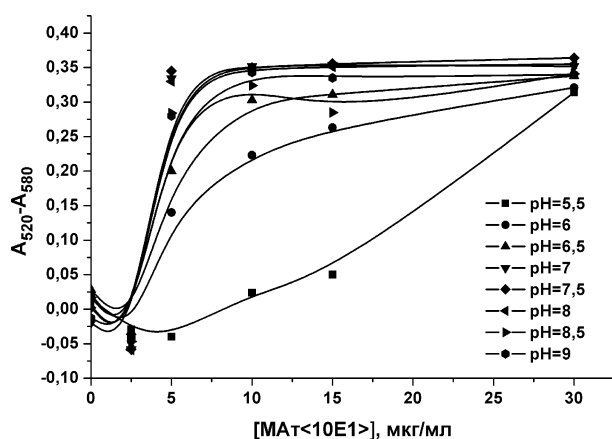


Рис. 2. Зависимости разности оптического поглощения ($A_{520} - A_{580}$) от концентрации МАт<10E1> для разных значений pH

уменьшается. Для получения меченых антител в качестве оптимального было выбрано pH раствора 7,0–7,5 для всех видов антител.

В изученном диапазоне нагрузки золя по антителам в пределах 0–30 мкг/мл минимальная насыщающая концентрация антител, обеспечивающая наибольшую устойчивость золя к коагулирующему действию электролита, определяется выходом кривой на плато, и для МАт<10Е1> она составила 10 мкг на мл золя, МАт<9F3> – 15 мкг/мл, а для поликлональных антител ПАт<K5> и ПАт<K10> – 10 мкг/мл. Данные концентрации были использованы при получении конъюгатов антител с наночастицами золота.

На следующем этапе была выбрана пара антител, иммобилизованных на фазе и меченых наночастицами золота, обеспечивающих максимальную чувствительность анализа с-БСЖК. Были изучены все возможные комбинации, когда на фазе нанесен один вид антител, а конъюгат приготовлен с другими антителами. Для каждой пары антител был проведен ИХА для стандартных растворов с-БСЖК в ФБСТ (рис. 3). Наилучший предел обнаружения и самый высокий сигнал был получен для пары моноклональных антител МАт<10Е1>, иммобилизованных на мембране, и МАт<9F3>, конъюгированных с наночастицами золота (рис. 4, кривая 1). В случае использования поликлональных антител ПАт<K5>, иммобилизованных на мембране в комбинации с тем же конъюгатом, сигнал заметно уменьшается и наблюдается присутствие фонового сигнала (рис. 4, кривая 2). Результаты анализа с мечеными МАт<10Е1> были хуже как с моноклональными, так и с поликлональными антителами (рис. 4, кривые 3, 4 соответственно). При использовании поликлональных антител, иммобилизованных на мембране и конъюгированных с наночастицами золота, например ПАт<K5> с конъюгатом Au-ПАт<K10> (рис. 4, кривая 5), наблюдается низкий сигнал, присутствие фонового сигнала и самая низкая чувствительность анализа.



Рис. 3. Результаты определения стандартных растворов с-БСЖК, нг/мл: а – 0; б – 5; в – 10; г – 20; д – 50; е – 100

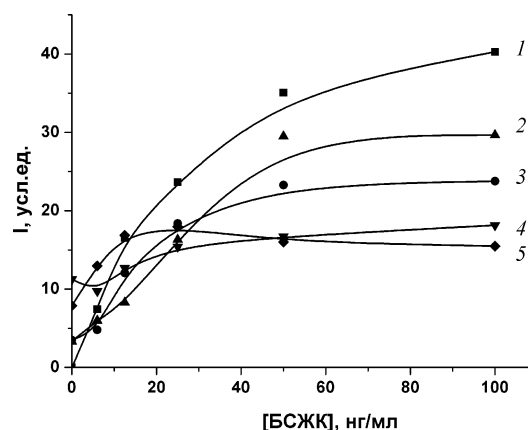


Рис. 4. Градуировочные графики, полученные для определения с-БСЖК: 1 – иммобилизованы МАт<10Е1>, конъюгат с МАт<9F3>; 2 – ПАт<K5>, конъюгат с МАт<9F3>; 3 – МАт<9F3>, конъюгат с МАт<10Е1>; 4 – ПАт<K5>, конъюгат с МАт<10Е1>; 5 – ПАт<K5>, конъюгат с ПАт<K10>

В ходе дальнейшей работы были выбраны две мембраны (аналитическая и для нанесения образца), оптимизированы концентрации специфических иммунореагентов, а также условия иммобилизации антител на мембране. При увеличении концентрации сорбированных антител МАт<10Е1> (с 0,25 до 1 мг/мл в ФБС) и меченых антител МАт<9F3> (с 5 до 10 мкл на полоску) происходит увеличение интенсивности регистрируемого сигнала и наклона градуировочного графика на начальном отрезке, что характерно для сэндвич-методов анализа. Однако при концентрации МАт<10Е1> 1 мг/мл наблюдалось появление фонового сигнала, т.е. наличие неспецифического взаимодействия в условиях отсутствия с-БСЖК в анализируемом растворе, что крайне важно при визуальной оценке результатов анализа. Таким образом, в качестве оптимальных были выбраны следующие условия: для иммобилизации на мембране МАт<10Е1> с концентрацией 0,5 мг/мл и меченные золотом МАт<9F3> в количестве 7,5 мкл ($A_{520} = 2$ опт. ед.). Типичный градуировочный график представлен на рис. 5 (кривая 1). Разработанный метод позволяет определять концентрацию с-БСЖК в диапазоне 2–100 нг/мл. Предел обнаружения метода составил 2 нг/мл с-БСЖК. Метод характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов, коэффициент вариации для стандартных концентраций с-БСЖК не превышал 8%.

Для подтверждения достоверности разработанного метода ИХА было проведено определение с-БСЖК в сыворотках крови здоровых людей (контрольная группа) и пациентов с клинически подтвержденным диагнозом ОИМ. Предварительно было изучено влияние

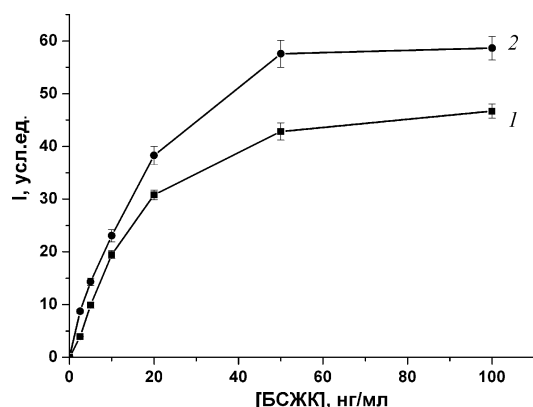


Рис. 5. Градуировочные графики, полученные для стандартных растворов с-БСЖК, приготовленных: 1 – в сыrovотке крови, не содержащей с-БСЖК, разбавленной в 5 раз; 2 – в ФБСТ

компонентов сыrovотки крови на результаты анализа (рис. 5, кривые 1 и 2) и показано, что чувствительность анализа и аналитический сигнал увеличиваются по сравнению с буферным раствором. Предел обнаружения метода в этом случае составил 1,5 нг/мл, что соответствует 7,5 нг/мл с-БСЖК в анализируемом образце сыrovотки крови.

При анализе сыrovоток крови в контрольной группе ($N = 25$) в аналитической части тест-полоски наблюдалась только одна контрольная полоса. Это свидетельствует о том, что концентрация с-БСЖК в них ниже предела обнаружения нашего метода (7,5 нг/мл). При анализе образцов сыrovоток крови пациентов с подтвержденным диагнозом ОИМ ($N = 10$) тест показывал положительный результат (две окрашенные линии в аналитической зоне) для всех образцов (таблица). Образцы брали при поступлении пациентов в больницу и далее через каждые 6 ч. После 6 ч наблюдалось снижение интенсивности сигнала в тестовой зоне, а через 24 ч превышение порогового значения концентрации с-БСЖК было только у одного пациента.

Таким образом, разработанный метод для экспресс определения с-БСЖК может быть успешно использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений кардиологического профиля, а также в отделениях скорой помощи и кардиореанимации для подтверждения или опровержения диагноза на ранних стадиях возникновения ОИМ (с первого часа и более).

Результаты определения с-БСЖК в сыrovотках крови пациентов с диагнозом ОИМ методом ИХА

Номер опыта	с-БСЖК				
	при поступлении	через 6 ч	через 12 ч	Через 18 ч	Через 24 ч
50-010	+	+	+	-	-
50-028	+	+	+	-	-
50-039	+	+	+	+	-
67-004	+	+	+	+	-
67-006	+	+	-	-	-
67-007	+	+	+	-	-
67-009	+	+	+	+	+
67-010	+	+	-	-	-
67-013	+	+	+	+	-
67-014	+	+	+	+	-

(+) - положительный результат; (-) - отрицательный результат

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (проект № 16.512.11.2216).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glatz J.F.C., van der Vusse G.J. // Prog. Lipid. Res. 1996. **35**. P. 243.
2. Glatz J.F.C., Kleine A.H., Van Nieuwenhoven F.A., Hermes W.T., Van Diejen-Visser M.P., Van der Vusse G.J. // Br. Heart J. 1994. **71**. P. 135.
3. Glatz J.F.C., van der Vusse G.J., Simoons M.L. // Clin. Chim. Acta. 1998. **272**. P. 87.
4. Wodzig K.W.H., Pelsers M.M.A.L., Van der Vusse G.J., Roos W., Glatz J.F.C. // Ann. Clin. Biochem. 1997. **34**. P. 263.
5. Speiger H., Laterveer-Vreeswijk R.H., Glatz J.F.C., Nieuwenhuizen W., Hermens W.T. // Anal. Biochem. 2004. **326**. P. 257.
6. Tanaka T., Sohmiya K., Kitaura Y. // J. Immunoassay Immunochem. 2006. **3**. P. 225.
7. Chan C.P.Y., Sum K.W., Cheung K.Y., Glatz J.F.C., Sanderson J.E., Hempel A., Lehmann M., Renneberg I., Renneberg R. // J. Immunol. Methods. 2003. **279**. P. 91.
8. Grigorenko V., Andreeva I., Borchers T., Spener F., Egorov A. // Anal. Chem. 2001. **73**. P. 1134.
9. Frens G. // Nature Phys. Sci. 1973. **241**. P. 20.

Поступила в редакцию 15.08.2011

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC EXPRESS-ANALYSIS OF HUMAN HEART FATTY ACID BINDING PROTEIN FOR ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

E.A. Yakovleva, I.P. Andreeva, V.G. Grigorenko, A.P. Osipov

(Division of Chemical Enzymology)

As protein analyte the human heart fatty acid binding protein (H-FABP) was chosen, which is a new and sensitive marker for acute myocardial infarction. Rapid lateral flow immunoassay based on colloidal gold nanoparticles as a visual marker was developed for H-FABP detection in serum. The detection limit of the method was 1,5 ng/ml, the variation coefficient did not exceed 8%. With the developed test system was analyzed a set of serum samples periodically withdrawn from the patients with diagnosis of acute myocardial infarction (N = 10) over a period of 24 h after admission to the hospital and the results were positive; in case of healthy individuals (N = 25) test results were negative.

Key words: *immunochromatographic assay; acute myocardial infarction; human heart fatty acid binding protein.*

Сведения об авторах: *Яковлева Елена Алексеевна* – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (yakovlevahelena@gmail.com); *Андреева Ирина Петровна* – ст. науч. сотр. ЗАО «НВО Иммунотех», канд. хим. наук (imtek@newmail.ru); *Григоренко Виталий Георгиевич* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); *Осипов Александр Павлович* – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (APOsipov@mail.ru).