

УДК 57.088.1

ИЗМЕРЕНИЕ АДСОРБЦИИ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG НА ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫЕ МЕМБРАНЫ ИЗ НЕЙЛОНА-6

© 2022 г. А.М. Сенковенко*, А.М. Мойсенович*, А.А. Маслакова*,
Е.Р. Павлова**, Д.В. Багров*

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

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435, Москва, Малая Пироговская ул., 1а

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

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 06.04.2022 г.

Биосенсоры на основе электроформованных мембран имеют ряд преимуществ перед традиционными биосенсорами, в которых рецепторный слой иммобилизован на плоском носителе. Развитая поверхность электроформованной мембраны позволяет увеличить количество сайтов связывания антитела, но не препятствует использованию классических методов детекции, например, электрохимических. В работе изучена способность электроформованных мембран из нейлона-6 адсорбировать антитела класса IgG. Показано, что при концентрации антител 2.5–10 мкг/мл связывающая способность мембран имеет порядок ~100 мкг/г, а доля антител, адсорбированных из раствора, составляет 40–45%. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показано, что адсорбированные антитела более эффективно вымываются с внешних слоев мембраны, чем с внутренних. Методика измерения связывающей способности мембран, описанная в данной работе, может быть полезна для разработки иммуносенсоров.

Ключевые слова: электроспиннинг, полимерная мембрана, адсорбция, нейлон-6, антитела, иммуноанализ.

DOI: 10.31857/S0006302922030140, EDN: AOOXHP

Биосенсоры – это устройства, предназначенные для обнаружения аналита в пробе и измерения его концентрации. Основополагающим этапом создания биосенсора является функционализация поверхности подложки молекулами, распознающими аналит, например, антителами или высокоаффинными лигандами. Процедура создания рецепторного слоя должна не только иммобилизовать молекулы на поверхности, но также сохранять их функциональность и обеспечивать диффузию аналита [1].

В качестве твердого носителя для иммобилизации рецепторного слоя могут служить мембраны, сформированные методом электроспиннинга (электроформования). Обычно они состоят из нановолокон с диаметрами в диапазоне 100 нм – 1 мкм, что обеспечивает большую площадь поверхности и потенциально высокую связывающую способность. Электроформованные мембраны находят применение в электрохимических

и оптических биосенсорах [2]. Для иммобилизации биологически активных молекул на поверхности волокон существует множество процедур [3]. В простейшем случае рецепторный слой иммобилизуют с помощью физической адсорбции. Ее используют при проведении иммуноферментного анализа в полистирольных планшетах [4], при изготовлении устройств бумажной микрофлюидики [5] и тест-полосок [6], а также сенсоров, использующих электроформованные мембраны в качестве носителей [7, 8]. При разработке биосенсоров возникают задачи оценки связывающей способности подложки по отношению к молекулам рецепторного слоя, а также контроля его однородности. В данной работе эти задачи решены на примере электроформованных мембран из нейлона-6 и мышинных антител класса IgG.

Нейлоны – это класс синтетических термопластичных полиамидов, широко применяемых в производстве одежды и напольных покрытий, для упаковки пищевых продуктов, армирования резины и т.д. Коммерчески доступные нейлоны включают нейлон-6, нейлон-4/6, нейлон-6/6,

Сокращения: КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, PBS – фосфатно-солевой буфер.

нейлон-6/10, нейлон-6/12, нейлон-11 и нейлон-12. Числовая номенклатура нейлона отражает количество атомов углерода в одном мономерном звене (например, нейлон-6), а в случае, если звено нейлона образовано димером, первое число отражает количество атомов углерода в диамине, а второе — в дикарбоновой кислоте (например, нейлон-4/6).

Нейлоны часто используются для иммобилизации белков, в том числе антител. Пористые мембраны из нейлона более активно адсорбируют альбумин, чем мембраны из поливинилиденфторида или большинство мембран из нитроцеллюлозы [9]. Нейлоновые мембраны могут использоваться в разных типах блоттинга [10, 11], для создания электрохимических иммуносенсоров [12] и в других приложениях. Нейлон-6 (рис. 1) гидрофилен (краевой угол смачивания сплошной пленки, приготовленной из расплава, составляет 70° [13]), поэтому мембраны из него хорошо смачиваются водными растворами. Если электроформованная мембрана используется в качестве элемента биосенсора и не полностью смачивается анализируемой пробой, предел детекции может ухудшаться [14].

В данной работе описана методика измерения адсорбции антител класса IgG на электроформованные мембраны. В основе этой методики лежит флуориметрия; для визуализации структуры мембран использованы методы сканирующей электронной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электроспиннинг. Мембраны были изготовлены из раствора нейлона-6 (Sigma-Aldrich, США) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол («ПиМ-Инвест», Россия) с концентрацией 100 мг/мл. Электроспиннинг проводили на установке Nanofiber Electrospinning Unit (Китай). Расстояние и разность потенциалов между иглой шприца и коллектором составляло 30 см и 30 кВ соответственно. Подача полимерного раствора осуществлялась с помощью шприцевого насоса со скоростью 2 мл/ч. Для оценки сорбционной емкости были подготовлены круглые мембраны диаметром 6 мм, которые были вырезаны с помощью лазерной гравировальной машины LaserPro Spirit GLS (GSS, Тайвань), оснащенной инфракрасным CO₂ лазером мощностью 100 Вт.

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы мембран из нейлона-6 покрывали слоем золота толщиной 20 нм с использованием установки IonCoater IB-3 (Eiko Engineering, Япония). Исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе TM 3000 (Hitachi, Япония) при напряжении 15 кВ.

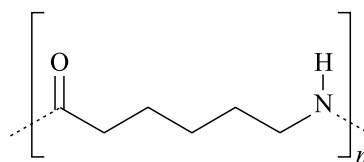


Рис. 1. Химическая структура нейлона-6.

Мечение антител флуорофором. Лиофилизированные иммуноглобулины мыши IgG («Имтек», Москва) растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 0.05% азидом натрия (PBS/NaN₃) в течение 10 мин при легком покачивании. Проводили дополнительную процедуру перевода препарата антител в буфер PBS/NaN₃ методом ультрафильтрации в фильтрующих блоках с порогом 3 кДа (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, UFC800324, Millipore, США). 200 мкг антител метили флуорофором Cy3 с помощью реагента Cy3-NHS (PA13101, Cytiva, США) в термостате при 37°C в течение часа. Препарат IgG-Cy3 очищали от свободного красителя ультрафильтрацией с порогом 30 кДа в фильтрующих блоках (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters, UFC503096, Millipore, США).

Определение связывающей способности. Мембраны из нейлона-6 индивидуально взвешивали на аналитических весах Analytical Plus (Ohaus, США) и помещали в лунки 96-луночного полистирольного планшета с плоским дном (Greiner Bio-One, США). Готовили разведения антител в PBS в концентрациях 10, 5 и 2.5 мкг/мл и добавляли в лунки планшета с мембранами по 100 мкл раствора, а также в пустые лунки для калибровки. На каждую концентрацию антител брали по четыре мембраны. Далее продолжали титровать антитела в пробирках Protein LoBind Tube (022431081, Eppendorf AG, Германия) с шагом в два раза до нижней концентрационной точки, соответствующей 9.77 нг/мл антител, и добавляли по 100 мкл в соответствующие лунки. Планшет герметично закрывали клейкой пленкой, накрывали фольгой и инкубировали в течение полутора часов при комнатной температуре при покачивании со скоростью 200 об/мин. Далее каждую мембрану трижды отмывали PBS с 0.05% Tween-20 в объеме 100 мкл, затем трижды в PBS. Для этого мембраны аккуратно подхватывали пинцетом и переносили в следующий ряд планшета. После последней отмывки мембраны извлекали из растворов и готовили для исследования методом КЛСМ.

Флуориметрия. Измерения флуоресценции от ячеек планшета проводили на многофункциональном планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), оснащенный ксеноновой лампой. Возбуждение флуоресценции происходило на длине волны 530 нм (с использованием

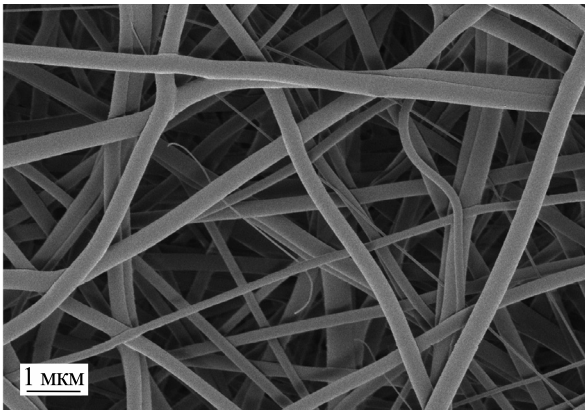


Рис. 2. Изображение поверхности электроформованной мембраны из нейлона-6, полученное методом сканирующей электронной микроскопии.

фильтра 530/20 нм), регистрация эмиссии – на 580 нм (с использованием фильтра 580/30 нм). Перед экспериментом проводили предварительную оптимизацию фокусного расстояния и регулировку усиления сигнала относительно лунки с заведомо максимальным сигналом (точка калибровки с максимальной концентрацией IgG-Су3). Флуоресценцию регистрировали с помощью верхней оптической системы.

По величине флуоресцентных сигналов вычисляли массы антител в каждой из лунок. Калибровочную кривую, т.е. зависимость массы антител в лунке от интенсивности флуоресценции, строили в двойных логарифмических координатах. Связывающую способность мембраны Q вычисляли по формуле

$$Q = \frac{m_{\text{нач}} - m_{\text{ост}} - \sum_i m_{\text{отм } i}}{m_{\text{мембраны}}},$$

долю адсорбированного белка A вычисляли по формуле

$$A = \frac{m_{\text{нач}} - m_{\text{ост}} - \sum_i m_{\text{отм } i}}{m_{\text{нач}}},$$

где $m_{\text{нач}}$ – начальная масса антител в растворе, в который помещали мембрану с массой $m_{\text{мембраны}}$, $m_{\text{ост}}$ – масса антител, оставшихся в лунке после инкубации мембраны в ней, $m_{\text{отм } i}$ – масса антител в тех лунках, в которых мембрану отмывали.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Измерения методом КЛСМ проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Мембраны, обработанные растворами флуоресцентно меченых антител, размещали между парой покровных стекол в смеси глицерина и желатина. Образец

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.

Для визуализации структуры мембран и измерения их толщины настройки (мощность лазера, коэффициент усиления, скорость сканирования, количество точек) оптимизировали для каждого образца. Изображения получали с помощью объективов CFI Plan Apo VC 20×/0.75 и Apo TIRF Plan Fluor 63×/1.49. Для оценки количества адсорбированных антител изображения получали при одинаковой мощности лазера, чувствительности детектора и скорости сканирования; использовали объектив CFI Plan Apo VC 20×/0.75.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электроформованные мембраны были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 2). Мембраны состояли из гладких цилиндрических волокон без утолщений и «бусин» на их поверхности. Средний диаметр волокон мембраны составил 280 ± 150 нм (среднее \pm стандартное отклонение).

Электроформованные мембраны имели диаметр 6 мм и толщину $\sim 30\text{--}70$ мкм – их массы составляли менее 1 мг. Масса антител, адсорбированных на такую мембрану, еще на несколько порядков меньше, и зарегистрировать ее на весах практически невозможно. Тем не менее, ее можно вычислить с помощью оптических измерений.

Для растворов иммуноглобулинов мыши с концентрациями 2.5, 5 и 10 мкг/мл были вычислены связывающие способности мембран, а также доли белка, адсорбированного мембраной (рис. 3). Связывающая способность увеличивалась при увеличении концентрации антител, что можно ожидать при малых концентрациях. По данным атомно-силовой микроскопии при адсорбции глобулярных белков на плоскую поверхность из раствора с концентрацией $\sim 1\text{--}10$ мкг/мл, формируется не монослой, а покрытие из отдельных молекул [15].

Для сравнения: при адсорбции липазы на волокнистые мембраны из нейлона-6 также наблюдались линейные зависимости связывающей способности от концентрации белка в растворе [16]. Эти эксперименты выполнялись с растворами, имеющими концентрации порядка ~ 1 мг/мл, что как минимум на два порядка больше, чем концентрации, использованные в данной работе. Величина связывающей способности нейлоновых мембран по отношению к IgG составляла менее

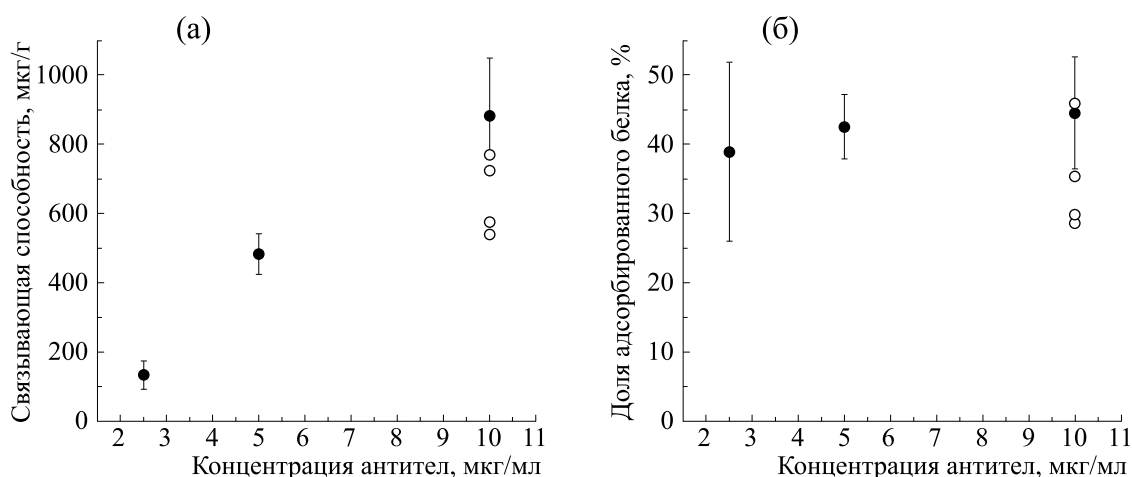


Рис. 3. Зависимости удельной связывающей способности мембраны (а) и доли адсорбированного белка (б) от концентрации антител в растворе. Светлые кружки соответствуют экспериментам с мембранами из нейлона, которые инкубировали в PBS, а затем погружали в раствор антител с концентрацией 10 мкг/мл.

1 мг/г (рис. 3а) — настолько малые значения, скорее всего, также объясняются низкими концентрациями антител. Для количественного измерения адсорбции антител на электроформованные мембраны массу антител иногда нормируют на площадь мембраны. При таких расчетах мы получаем адсорбцию в диапазоне 0.35–1.4 мкг/см² — это близко к адсорбции антител на мембраны из нитроцеллюлозы (1.36 ± 0.64 мкг/см²) и полилактида (6.35 ± 0.64 мкг/см²) из раствора с концентрацией 20 мкг/мл [17].

По проведенным измерениям можно оценить долю молекул белка, адсорбированных на мембрану после ее инкубации в растворе (рис. 3б). Эта величина слабо зависела от концентрации антител, и составляла 40–45%. Для сравнения: электроформованные мембраны из поли(ε-капролактона) в аналогичных экспериментах адсорбировали 35% антител, и эту долю можно было увеличить до 52%, если добавить в раствор 200 мМ Na₂SO₄ [18]. Указанная доля определяется прежде всего энергией взаимодействия между антителами и поверхностью нейлоновых мембран. Оказалось, что если мембраны предварительно проинкубировать в PBS в течение 12 ч, то доля адсорбированных антител снижается. Такой эксперимент был проведен с растворами антител, концентрация которых составляла 10 мкг/мл — соответствующие количественные характеристики адсорбции антител показаны на рис. 3 светлыми кружками (приводятся индивидуальные экспериментальные точки, среднее значение составляет $35 \pm 7\%$). Снижение адсорбции может

объясняться тем, что инкубация мембран в PBS компенсирует электростатический заряд, который остается после электроспиннинга [19].

После инкубации в растворах флуоресцентно меченых антител мембраны исследовали методом КЛСМ. Типичное изображение мембраны показано на рис. 4.

Характерная яркость увеличивалась по мере увеличения концентрации — это заметно, если получить изображения всех мембран при одних и тех же настройках (рис. 5). Действительно, при постоянстве динамического диапазона на полученных изображениях мембран, обработанных антителами, мода интенсивности увеличивалась по мере увеличения концентрации антител.

Метод КЛСМ позволяет увидеть волокнистую структуру и измерить толщину окрашенного слоя мембран — она была линейно связана с их массой (рис. 6а), (коэффициент детерминации $R^2 = 0.88$). Согласно полученным изображениям (рис. 4), центральная область мембраны (слои) флуоресцирует более интенсивно, чем поверхность, т. е. с поверхности антитела были смыты. Действительно, молекулы белка, иммобилизованного на поверхности с помощью физической адсорбции, могут быть десорбированы с нее сравнительно легко, что было показано для многих поверхностей и, в частности, для нейлона-6 [9]. Таким образом, толщина окрашенного слоя систематически оказывалась меньше, чем толщина мембраны.

Электроформованные мембраны, полученные в одинаковых условиях, могут иметь вариации толщины, а также вариации диаметров волокон и

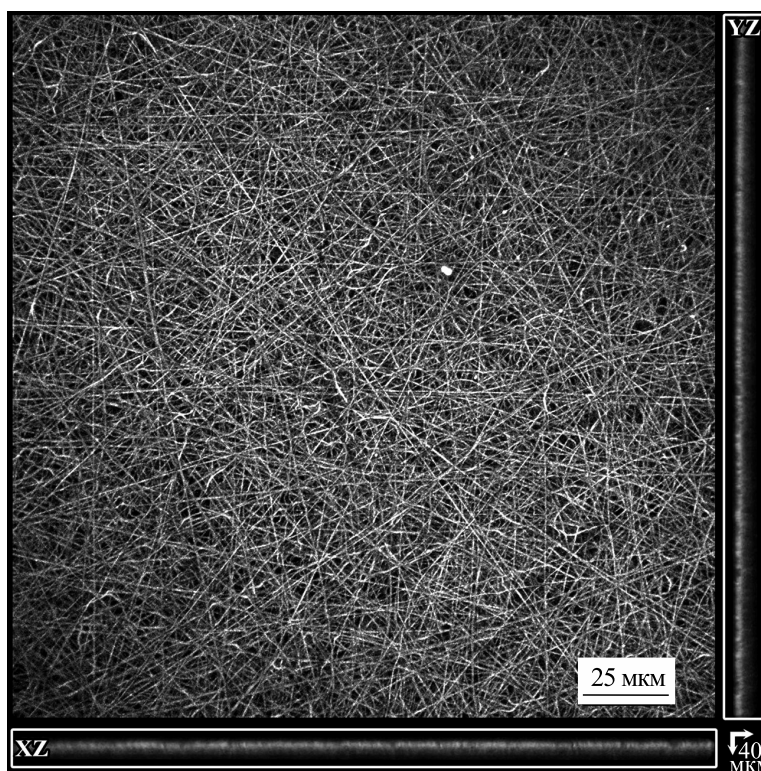


Рис. 4. Изображение мембраны, обработанной раствором флуоресцентно меченых антител с концентрацией 10 мкг/мл, полученное с использованием КЛСМ.

плотности их укладки [20]. Наблюдаемая линейная зависимость толщины окрашенного слоя от массы мембран косвенно указывает на постоянство их плотности — с учетом неоднородностей флуоресцентного окрашивания. Эти неоднородности, в частности, приводили к разбросу

измеряемых значений толщины мембраны. Действительно, при увеличении концентрации снижалось стандартное отклонение толщины окрашенного слоя и относительная погрешность измерения толщины (отношение стандартного отклонения к средней толщине, рис. 6б).

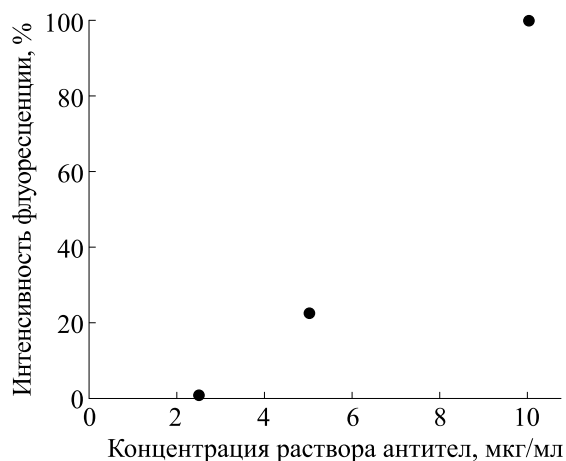


Рис. 5. Зависимость моды интенсивности флуоресценции на изображениях мембран от концентрации раствора антител, в котором их инкубировали.

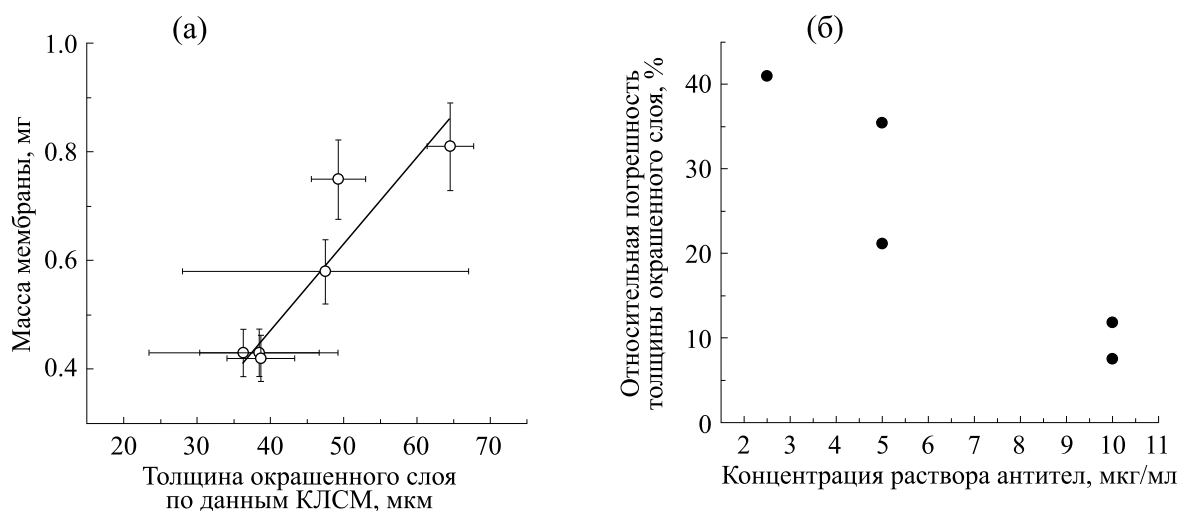


Рис. 6. Взаимосвязь между массой мембраны и ее толщиной (а) и влияние концентрации раствора антител на относительную погрешность толщины мембран, измеряемой КЛСМ (б). Каждая точка на графике соответствует одной мембране.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом электроспиннинга были изготовлены электроформованные мембраны с толщиной ~40–70 мкм, состоящие из волокон со средним диаметром 280 ± 150 нм. Была измерена адсорбция антител IgG на поверхность этих мембран; после полутора часов инкубации связывающая способность составляла порядка ~100 мкг/г и увеличивалась при увеличении концентрации антител в растворе.

При разработке биосенсоров необходимо контролировать рецепторный слой – его структуру, однородность, стабильность и воспроизводимость. Если подложкой для его иммобилизации является электроформованная мембрана, то исследование свойств рецепторного слоя может оказаться сложным, вследствие гибкости и оптической непрозрачности (диффузного рассеяния света) мембран. Описанные в данной работе методики помогают преодолеть эти сложности, измерить связывающую способность электроформованных мембран и проконтролировать однородность адсорбции молекул на поверхности волокон.

БЛАГОДАРНОСТИ

Измерения методами сканирующей электронной микроскопии и КЛСМ выполнены с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова до 2020 года. Авторы работ благодарят Научно-образовательную школу МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. A. Mercante, A. Pavinatto, T. S. Pereira, et al., *Sensors and Actuators Reports* **3**, 100048 (2021).
2. N. Aliheidari, N. Aliahmad, M. Agarwal, and H. Dalir, *Sensors* **19**, 3587 (2019).
3. S. Smith, K. Goodge, M. Delaney, A. Struzyk, et al., *Nanomaterials* **10**, 1 (2020).
4. A. Nieto, A. Gayá, C. Moreno, et al., *Ann. l'Institut Pasteur / Immunol.* **137**, 161 (1986).
5. R. C. Murdock, L. Shen, D. K. Griffin, et al., *Anal. Chem.* **85**, 11634 (2013).
6. Z. Chen, K. Zhou, W. Ha, et al., *Food Agric. Immunol.* **30**, 497 (2019).
7. D. Yang, X. Niu, Y. Liu, et al., *Adv. Mater.* **20**, 4770 (2008).
8. J. Wang, Q. S. Kang, X. G. Lv, et al., *PLoS One* **8**, 1 (2013).
9. E. R. Tovey and B. A. Baldo, *J. Biochem. Biophys. Methods* **19**, 169 (1989).

10. S. Pierotti, C. Albano, A. Milandri, et al., *Toxicon* **49**, 36 (2007).
11. A. Dubitsky, D. DeCollibus, and G. A. Ortolano, *J. Biochem. Biophys. Methods* **51**, 47 (2002).
12. R. Shaimi and S. C. Low, *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 40 (2018).
13. *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Ed. By F. M. Fowkes (Advances in Chemistry, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1964), vol. 43.
14. J. S. Hersey, A. Meller, and M. W. Grinstaff, *Anal. Chem.* **87**, 11863 (2015).
15. G. C. Ratcliff and D. A. Erie, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5632 (2001).
16. H. Y. Y. Zeng, X. Y. Y. Liu, P. He, et al., *Biocatal. Bio-transformation* **32**, 188 (2014).
17. F. Ma, L. He, E. Lindner, and D. Y. Wu, *Appl. Surf. Sci.* **542**, 21 (2021).
18. D. Wu, D. Han, and A. J. J. Steckl, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 252 (2010).
19. H. Esfahani, M. P. Prabhakaran, E. Salahi, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **443**, 143 (2015).
20. L. D. Burke, K. A. Blackwood, and F. Z. Volpato, in *Electrospun Biomater. Relat. Technol.*, Ed. by J. Almodovar (Springer Int. Publ., Cham, 2017), pp. 1–19.

Measurements of IgG Antibodies Adsorption onto Electrospun Nylon-6 Membranes

A.M. Senkovenko*, A.M. Moysenovich*, A.A. Maslakova*,
E.R. Pavlova*, **, and D.V. Bagrov*

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

**Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119435 Russia

Biosensors based on electrospun membranes have some advantages over the traditional biosensor devices that include a receptor layer immobilized on a flat support. Due to the large surface area of the electrospun membrane, the number of analyte-binding sites increases but it does not interfere with traditional detection methods (e.g., electrochemical detection). In this study, the adsorption of IgG antibodies onto electrospun nylon-6 membranes was explored. It was shown that at an antibody concentration of 2.5–10 µg/ml, the membrane had a binding capacity of ~100 µg/g and the volume fraction of the adsorbed antibodies was 40–45%. Using laser scanning confocal microscopy, it was found that the adsorbed antibodies were washed from the outer layers of the membrane more efficiently than from the inner layers. The procedure for measuring the binding capacity of membranes introduced in this paper can be a useful tool in developing immunosensors.

Keywords: electrospinning, polymer membrane, adsorption, nylon-6, antibodies, immunoassay