

МЕТОД КАЛИБРОВОЧНЫХ КРИВЫХ ДЛЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЭКСПРЕСС-ТЕСТОВ. Ч. 2. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ЭКСПРЕСС-ТЕСТЫ С КВАНТОВЫМИ ТОЧКАМИ

А. Н. БЕРЛИНА**, **Ю. Ю. ВЕНГЕРОВ*****, **С. С. ГОЛУБЕВ***, **Б. Б. ДЗАНТИЕВ****,
А. В. ЖЕРДЕВ*, **Ю. В. КИСЕЛЕВА***, **Я. А. КОРОЛЕНКО***, **Ю. А. КУДЕЯРОВ***,
В. М. МАЛЮЧЕНКО*, **Н. А. ТАРАНОВА****

* Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы,
Москва, Россия, e-mail: kudeyarov@vniims.ru

** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

*** ООО «СИНТЭКО», Москва, Россия

Приведены результаты измерения характеристик квантовых точек, полученные методами просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии, а также динамического светорассеяния. Рассмотрен принцип работы специализированного микроанализатора «РЕФЛЕКОМ-Ф». Рассчитаны интенсивности флуоресценции тест-полосок с применением квантовых точек для построения калибровочных кривых и определения их характеристик.

Ключевые слова: флуоресценция, квантовые точки, флуоресцентная спектроскопия, спектрофотометрия, сканирующая микроскопия, динамическое светорассеяние, формфактор.

The results of measurement the quantum dots characteristics obtained by transmission electron microscopy, atomic-force microscopy and dynamic light scattering are presented. The principle of operation of specialized microanalyzer «REFLECOM-F» is considered. The intensities of fluorescence of test-strips with use of quantum dots were calculated and used for plotting of calibration curves and determination of their characteristics.

Key words: fluorescence, quantum dots, fluorescence spectroscopy, spectrophotometry, scanning microscopy, dynamic light scattering, formfactor.

В статье [1] были рассмотрены иммунохроматографические экспресс-тесты, где результат анализа оценивался по фотометрически регистрируемому окрашиванию определенных зон тест-полоски. В качестве меток использовались частицы коллоидного золота, доминирую-

щие в настоящее время среди коммерчески доступных экспресс-тестов. Так как в последние годы в качестве маркеров стали широко применяться так называемые квантовые точки (КТ) [2], детектируемые флуориметрически, возникает необходимость изучения метода калибровочных кривых для тестов с такими маркерами.

Прежде всего, следует рассмотреть причины перехода от классических маркеров к квантовым точкам и оценить преимущества такого перехода, поскольку методически тест-системы практически не отличаются друг от друга.

Известно, что при использовании микроанализатора для иммунохроматографических тест-систем измеряются коэффициент светового отражения (КСО) и светимость I аналитической полоски при неопределенной концентрации n конкретного антигена. По определению КСО равен отношению светового потока, исходящего от образца, к световому потоку излучения, падающего от входящего в состав микроанализатора источника. Поскольку КСО измеряется при фиксированном положении друг относительно друга средства измерений и тест-полоски, можно считать, что микроанализатор измеряет светимость тестовой полоски, вызванной излучением маркеров под действием падающего на полоску излучения.

Светимость I – это плотность потока световой энергии в данном направлении, т. е. $I = d\Phi/dS$, где $d\Phi$ – световой поток, испускаемый участком поверхности площадью dS . Таким образом, тестовая полоска начинает светиться, в том числе флюоресцирующим светом, только после возбуждения такого излучения внешним источником (осветителем). С этой точки зрения преимущество у материалов с высокой способностью к флуоресценции. Наибольшей популярностью среди них пользуются квантовые точки (квантовые полупроводниковые кристаллы). Широкое их использование в иммунных тест-системах началось в 2000-х гг. [3 – 6].

Квантовые точки, или quantum dots, представляют собой нанокристаллы с размером ядра (металлоидно-кристаллической структуры) 1 – 10 нм (в аналитических целях используются частицы диаметром 3 – 7 нм). Квантовые точки имеют свои важные особенности, обеспечивающие их конкурентные преимущества по сравнению с другими флуорофорами [3]. К ним относятся: высокая степень флуоресценции с квантовым выходом до 0,8; устойчивость к выцветанию; возможность

производства в виде коллоидной суспензии с узкой полосой излучения, а также получения желаемой длины волны испускаемого света за счет изменения состава и диаметра КТ, использования для построения мультианалитических систем на основе как спектральных, так и пространственных различий; применения подходящего источника возбуждающего света благодаря широкой полосе поглощения, уходящей в УФ-область; при этом длина испускаемого квантовыми точками излучения не зависит от длины волны поглощения; время затухания излучения, составляющее порядка 30 – 100 нс, что в разы превышает фоновую флуоресценцию и Рамановское рассеяние и позволяет значительно снизить фоновый сигнал; коммерческая доступность.

Особо выделим тот факт, что квантовые точки открывают возможности для создания мультианалитических систем. Например, использование для мечения антитела на каждый антиген метки со своей длиной волны испускания позволяет анализировать несколько соединений на одной полоске. При этом по степени окрашивания определенным цветом в аналитической зоне можно судить о наличии и концентрации каждого соединения [4]. Кроме того, мультианализ можно сделать и с одной меткой, фиксируя положение на мембране зон связывания для антител разной специфичности.

Принципиальная отличительная особенность КТ – возможность возбуждения в широком диапазоне длин волн, при этом положение пика эмиссии излучения не зависит от длины волны возбуждающего света. Варьируя размер наночастиц, например CdSe/ZnS или другого состава, можно охватить спектральный диапазон эмиссии от 400 нм до 2 мкм. Эта особенность показывает так называемый размерный эффект, характерный для наночастиц, когда изменение геометрического размера наночастицы приводит к изменению структуры ее электронной оболочки и, следовательно, к изменению спектрального диапазона эмиссии. При этом спектр эмиссии КТ представляет собой узкий симметричный пик шириной на полувысоте 20 – 40 нм.

Квантовые точки разных размеров, как отмечено выше, могут быть возбуждены волной одной и той же длины с получением одновременно детектируемой многоцветной флуоресценции. По сравнению с известным красителем родамином квантовые точки ярче в 20 раз, а устойчивость к фотовыцветанию по сравнению с тем же родамином у них в 100 раз выше [2]. Таким образом, КТ являются альтернативной заме-

ной органических красителей при использовании в био- и иммуно-анализах, чем и обусловлено растущее применение их для этих целей.

Поскольку КТ представляют собой относительно новый объект для использования в иммунохроматографических тест-системах, рассмотрим детально методы определения их свойств и характеристик, необходимых для иммуноанализа.

Наиболее значимыми для аналитической эффективности тест-систем характеристиками КТ и реагентов на их основе (конъюгатов наночастиц с антителами) являются: интенсивность флуоресценции и квантовый выход; размер; растворимость и стабильность в водных средах.

Одна из причин использования КТ в качестве метки в иммунохроматографическом анализе – их способность к стабильной и яркой флуоресценции [3]. Согласно [4], эти точки обладают высоким квантовым выходом (до 0,8), существенно превышающим результаты органических флуоресцентных красителей.

Определение качественных и количественных характеристик водорастворимых КТ проводят, как правило, методами флуоресцентной спектроскопии и спектрофотометрии. Например, идентификация качественного состава ядра полупроводниковых наночастиц методом спектрофотометрии выполняется по интенсивности и положению пика на соответствующих спектрах поглощения. С помощью флуоресцентной спектроскопии можно получить как качественные, так и количественные данные о КТ в растворе. Например, спектр поглощения раствора КТ, ядро которых состоит из CdSe и покрыто ZnS, достаточно широк. Для возбуждения можно использовать любую длину волны в диапазоне 280 – 500 нм. Обычно ограничиваются длинами волн, лежащими в УФ-области спектра.

В иммуноаналитических системах используются не нативные КТ, а их конъюгаты с биомолекулами. Авторами были исследованы конъюгаты полупроводниковых наночастиц (водорастворимые КТ состава CdSe/ZnS с пиком флуоресценции 625 нм, покрытые полимерной оболочкой с карбоксильными группами (Invitrogen (США) – КТ625) с моноклональными антителами против хлорамфеникола [7]. Оптические характеристики конъюгатов наночастиц и самих наночастиц определяли в одинаковых условиях: среда, концентрация КТ в растворе образца и в растворе конъюгата, длина волны возбуждения, размеры щелей возбуждения и испускания. Флуоресцентный спектр был получен

при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 400$ нм и щелях возбуждения и испускания, равных 3 нм. Интенсивность флуоресценции раствора конъюгата составляла 80 % по отношению к раствору КТ той же концентрации.

При описании размерных характеристик КТ выделяют два основных параметра: диаметры ядра частицы без учета оболочек и наночастицы, включающей ядро и две оболочки. Существующие методики позволяют получать ядро КТ с диаметром в диапазоне 3 – 7 нм. Это обеспечивает широкую вариабельность по положению пика флуоресценции. Наибольшее значение для комплектации экспресс-тестов на основе КТ имеет диаметр наночастицы с учетом всех ее оболочек. Он определяет скорость движения реагентов на основе КТ по рабочей мембране, что, в свою очередь, сказывается на отношении сигнал–шум при обработке результатов теста. Точные значения диаметров с учетом всех покрытий можно получить экспериментально, используя методы электронной микроскопии (ЭМ) и динамического рассеяния света.

Помимо методов просвечивающей ЭМ, для определения размерных характеристик КТ также применяют методы атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния.

Узкое распределение наночастиц по размерам обеспечивает в дальнейшем сходимость и воспроизводимость результатов анализов, проводимых с помощью тест-систем. В ходе оценки распределения выделяют такие параметры, как формфактор (отношение максимального линейного размера к минимальному) и среднее квадратическое отклонение (СКО) среднего диаметра, которое не должно превышать 15 %.

Диаметр ядра для квантовых точек состава CdSe – ядро, ZnS – полупроводниковая оболочка можно определить из теоретических расчетов согласно эмпирической формуле [5]:

$$D = (1,6122 \cdot 10^{-9})\lambda^4 - (2,6575 \cdot 10^{-6})\lambda^3 + (1,6242 \cdot 10^{-3})\lambda^2 - (0,4277)\lambda + 41,57,$$

где D – диаметр ядра квантовой точки; λ – длина волны максимального поглощения раствора КТ в видимой области спектра, отвечающей за окраску раствора КТ (из экспериментальных данных) в диапазоне длин волн 500 – 700 нм.

Исходя из спектрофотометрических данных и приведенной выше формулы, рассчитанный диаметр ядра частиц КТ был определен в $(5,4 \pm 0,2)$ нм.

Гомогенность растворов КТ и измерение параметров частиц контролируют с помощью электронной микроскопии. Этот метод позволяет определить размер частицы квантовых точек с учетом всех оболочек.

Анализ электронных микрофотографий использованных в работе КТ (рис. 1) подтвердил соответствие их размеров требованиям,

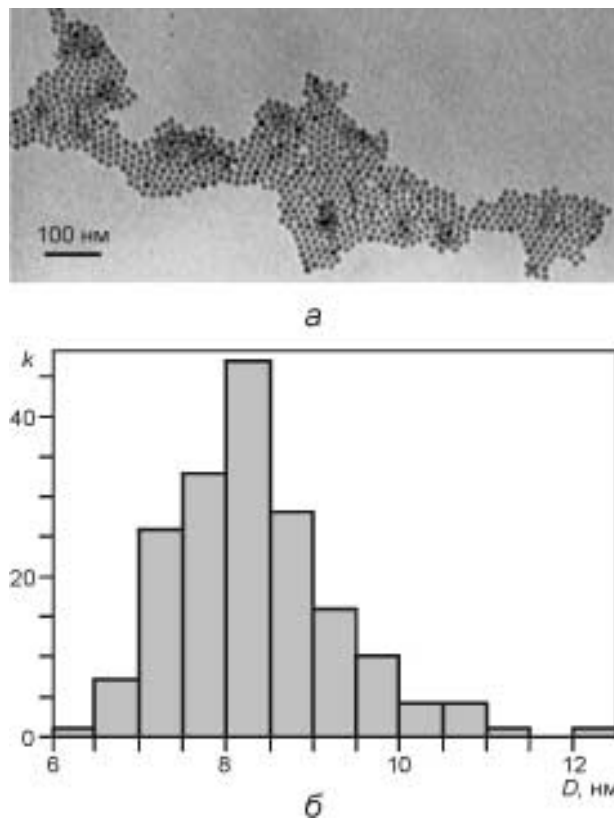


Рис. 1. Электронно-микроскопический снимок (а) и распределение частиц препарата квантовых точек QD ИТК 625 (б)

определяющим пригодность для тест-системы. На основании данных ЭМ были рассчитаны средние размеры наночастиц по большой и малой осям $((8,9 \pm 0,1) \text{ нм}$ по большой оси и $(7,7 \pm 1,1) \text{ нм}$ – по малой; $N = 100$) и средний диаметр, равный $(8,3 \pm 0,95) \text{ нм}$. Все эти величины отражают свойства наночастицы с учетом ее покрытий. Для этого же препарата КТ были определены формфактор, равный $(0,96 \pm 0,05)$, и расчетная площадь поверхности – $(100 \pm 22) \text{ нм}^2$.

Растворимость и стабильность полупроводниковых наночастиц в водных средах обеспечиваются благодаря созданию полимерной или органической оболочки на поверхности ядра КТ. Такое покрытие не только стабилизирует препарат, но и позволяет конъюгировать наночастицы с биомолекулами.

Как и в тест-системах на основе коллоидного золота, для превращения иммуноанализа из качественного метода в количественный используется метод калибровочных кривых (градуировочных характеристик), описанный в [1]. Его применение описано в методике [8], структура и содержание которой соответствуют требованиям [9].

Иммунохроматографические тест-системы с использованием КТ, как и соответствующие системы на основе коллоидного золота, также реализуются в двух вариантах: конкурентном и сэндвич-методе.

Методика построения калибровочных кривых описана в [1]. В частности, в этой работе были изложены общие соображения, относящиеся к обоснованию вида аппроксимирующей функции при обратной зависимости светимости аналитической полоски от концентрации определяемого вещества. Эти соображения привели к тому, что искомая функциональная зависимость может быть предложена в виде

$$I(n) = Ae^{-Bn} + C,$$

где A – светимость полоски при нулевой концентрации антигена; B – константа, описывающая наклон линейной зависимости $y = -Bn$ после линеаризирующего преобразования $y = \ln[(I - C)/A]$, а константа C введена для учета фонового сигнала.

Приведем аналогичные рассуждения, относящиеся к выбору прямой зависимости.

Как следует из описания принципа действия тест-системы для прямой зависимости [1], скорость dI/dn изменения светимости аналитической зоны тест-полоски в зависимости от концентрации опреде-

ляется двумя конкурирующими процессами. Первый процесс – постоянный приток в тестовую зону тест-полоски двойных комплексов антиген–конъюгат антител с квантовыми точками ($A/B = \text{const}$), второй – пропорциональная светимости скорость BI убывания двойных комплексов, что обусловлено их связыванием с антителами, иммобилизованными на мембране. Таким образом

$$dI/dn = A/B - BI.$$

Общее решение $I(n) = A(1 - e^{-Bn})$ выведенного неоднородного дифференциального уравнения используется при аппроксимации с помощью метода наименьших квадратов экспериментально измеренной прямой зависимости светимости от концентрации антигена.

Результаты этой аппроксимации для систем определения хлорамфеникола [10] (обратная зависимость) и онкомаркера ПСА – простатспецифического антигена (прямая зависимость) приведены на рис. 2.

Измерения светимости при построении калибровочных кривых проводили на микроанализаторе «РЕФЛЕКОМ», как и в случае тест-систем с коллоидным золотом, при этом условия эксперимента были аналогичными. Поэтому все заключения, относящиеся к метрологическим характеристикам тест-систем с коллоидным золотом, остаются справедливыми и для систем с КТ.

Так как для детектирования КТ в иммунохроматографических тест-системах, в отличие от традиционных маркеров, применяется крайне ограниченное

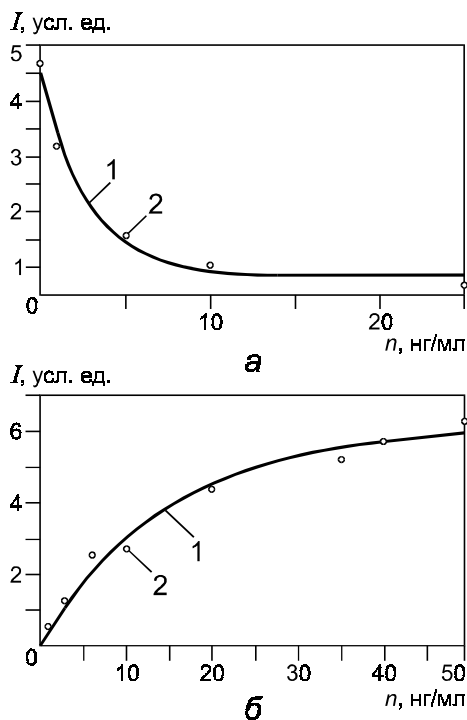


Рис. 2. Калибровочные кривые для хлорамфеникола (а) и маркера ПСА (б):

1 – аппроксимация; 2 – данные

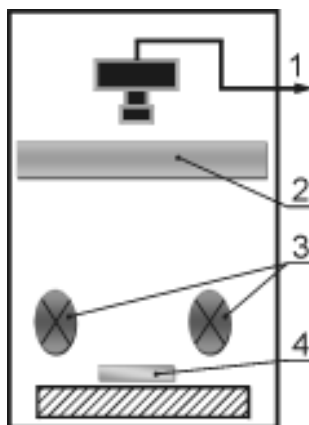


Рис. 3. Схема анализатора «РЕФЛЕКОМ-Ф»:

1 – вход-выход компьютера; 2 – отсекающий светофильтр; 3 – источники света возбуждения; 4 – исследуемый образец

число серийно производимого оборудования, рассмотрим подробнее принцип работы специализированного микроанализатора «РЕФЛЕКОМ-Ф», аналитические характеристики которого были изучены в рамках проекта.

Схема прибора представлена на рис. 3. Система освещения построена специально для регистрации результатов иммунохроматографических тестов с применением КТ, для которых характерен значительный спектральный сдвиг между длинами волн возбуждения и излучения.

Интегральная интенсивность линий рассчитывается благодаря программному обеспечению «Видеотест» на основе изображений, полученных с помощью видеоцифровой камеры (ВК). Тест-объект фиксируется в одном и том же положении относительно объектива ВК и элементов осветительного блока с помощью системы позиционирования.

Зоны обсчета на исходном изображении объекта, в которых будут проводиться вычисления, размечаются при первоначальной настройке анализа. В случае тест-полосок они представляют собой прямоугольные участки изображения, содержащие все диагностические линии, как показано на рис. 4. В дальнейшем при съемке тест-объектов, представляющих идентичные по размерам тест-полоски, на изображениях анализируются аналогичные прямоугольные участки. Изображения предварительно улучшаются, затем инвертируются и переводятся из исходного RGB-представления в полутоновое с использованием формулы

$$Y = 0,1B + 0,59G + 0,31R,$$

где Y – интенсивность в пределах 0 – 255; R , G , B – интенсивности красной, зеленой и синей составляющих цвета, соответственно.

Полученное таким образом инвертированное полутоновое изображение проецируется на направление продольной оси полоски, т. е. для каждой точки вдоль этого направления суммируются яркости всех

пикселей, лежащих на нормали, проходящей через эту точку. Результат нормируется на ширину полоски. Таким образом, для всех точек продольной оси определяется средняя яркость точек в поперечном направлении.

Интегральные интенсивности рассчитываются уже на основе полученной денситограммы. Границы обсчитываемых пиков находятся с помощью специальной процедуры. Для этого из исходной денситограммы вычитается фон, за который принимается кривая, полученная сглаживанием с широким окном усреднения, заведомо существенно превышающим ожидаемую ширину пиков. После этого денситограмма принимает вид серии пиков, возвышающихся над нулевым уровнем интенсивности. Их границы находятся автоматически, а интегральная интенсивность каждого из них вычисляется как сумма интенсивностей в каждой точке между его границами. В качестве окончательной оценки для каждой из линий автоматического разбиения выбирается значение суммарной интенсивности.

Таким образом, сопоставлены два варианта регистрации: без отсекающего фильтра и с размещением перед регистрирующей видеокамерой отсекающего фильтра с пропусканием света длиной волны более 630 нм (рис. 5). Показана предпочтительность последнего варианта.

Расчитанные описанным образом интенсивности флуоресценции тест-полосок с помощью квантовых точек были использованы для построения калибровочных кривых и их характеристик.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (государственный контракт 120/170 от 26 мая 2011 г. в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008 – 2011 годы») и Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № П423 от 12 мая 2010 г. в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приори-

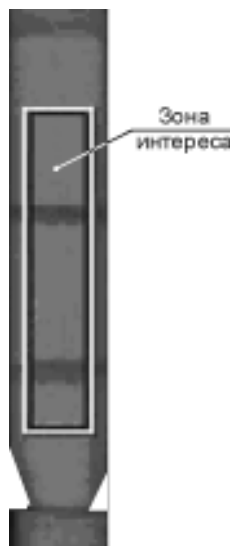


Рис. 4. Зона двухзонной иммунохроматографической тест-системы, где выполняется регистрация изображения с помощью микроанализатора «РЕФЛЕКОМ-Ф»

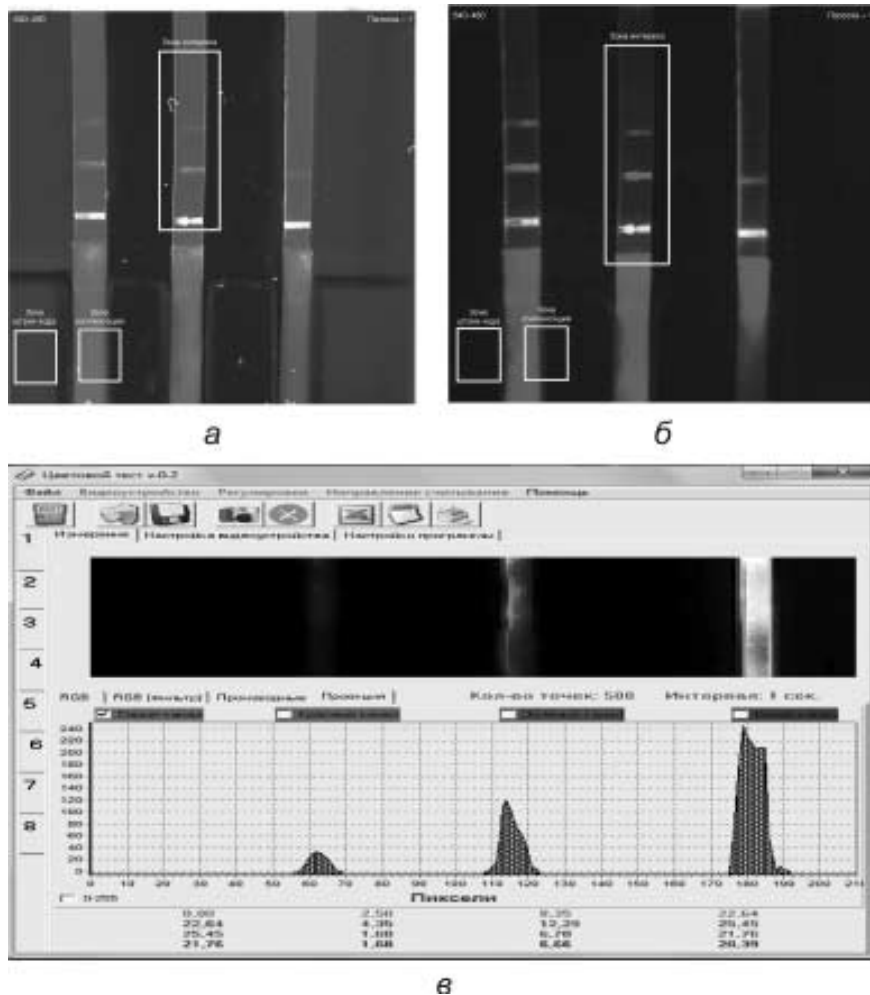


Рис. 5. Изображения тест-полосок с КТ, полученные без отсекающего фильтра (а) и с ним (б). Пример гистограммы обсчета тест-полоски с КТ (в)

тетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы»).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. **Голубев С. С. и др.** Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Ч. 1. Иммунохроматографические экспресс-тесты с коллоидным золотом //Метрология. 2012. № 10. С. 8 – 29.
2. **Chan W.C., Nie S.** Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection //Science. 1998. N 281 (5385). P. 2016-8.
3. **Mattoussi H. e. a.** Luminescent quantum dot-bioconjugates in immunoassays, FRET, biosensing, and imaging applications //J. Assoc. Lab. Automat. 2004. N 9 (1). P. 28 – 32.
4. **Algar W. R., Tavares A. J., Krull U. J.** Beyond labels: a review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction //Anal. Chim. Acta. 2010. N 673 (1). P. 1 – 25.
5. **Wong R., Tse H.** Lateral Flow Immunoassay /Ed. R. Wong, H. Tse. N. Y.: Humana Press, 2009.
6. **Lambert J. L., Fisher A. M.** Diagnostic assays including multiplexed lateral flow immunoassays with quantum dots //US Pat. App. 2006. N 11 (463). P. 525.
7. **Sutherland A. J.** Quantum dots as luminescent probes in biological systems //Current Opinion in Solid State and Materials Science. 2002. N 6(4). P. 365 – 370.
8. **Resch-Genger U. e. a.** Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels //Nature methods. 2008. N 5(9). P. 763 – 75.
9. **Таранова Н. А. и др.** Получение конъюгатов антител с квантовыми точками для аллергодиагностики //Естественные и технические науки. 2012. № 1 (57). С. 72 – 80.
10. **Berlina A. e. a.** Development of quantum dots-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk // Book Abstracts 5th Intern. Symp. Recent Advantages in Food Analysis (RAFA-2011). 2011. Prague (Czech Republic). P. 109.

Дата принятия 11.09.2012 г.