

УДК 543.9:543.068.8:53.082.56

© Н. А. Есикова, А. А. Евстапов, Т. В. Антропова

МИКРОФЛЮИДНОЕ УСТРОЙСТВО С ОПТИЧЕСКИМ СЕНСОРНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ НА ОСНОВЕ НАТРИЕВОБОРОСИЛИКАТНОГО ПОРИСТОГО СТЕКЛА ДЛЯ ИММУННОГО АНАЛИЗА

В статье представлены результаты исследований по постановке конкурентного иммунного анализа на пористом стекле SBS-МАП (средний размер пор 490 нм, пористость 50 %) и в микрофлюидном устройстве с интегрированным сенсорным элементом. Продемонстрирована возможность обнаружения инсулина в диапазоне концентраций ($2.9 \cdot 10^{-7} \div 2.3 \cdot 10^{-6}$) М в 600 мкл пробы на сенсорном элементе и в 40 мкл пробы в микрофлюидном устройстве с интегрированным сенсорным элементом.

Кл. сл.: микрофлюидное устройство, конкурентный иммунный анализ, натриевоборосиликатное пористое стекло

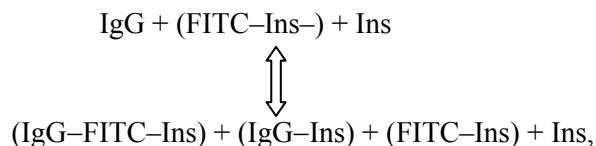
ВВЕДЕНИЕ

Разработка биосенсорных систем на основе микрофлюидных технологий является одним из перспективных направлений аналитического приборостроения [1]. Благодаря высокой специфичности связывания широкое распространение получили иммунные методы анализа [2]. Наиболее чувствительным методом детектирования результата иммунной реакции является флуоресцентный метод [3, с. 259–262]. Применение натриевоборосиликатных пористых стекол (ПС), обладающих такими свойствами, как термическая, химическая и биологическая устойчивость, прозрачность в видимой области спектра в сочетании с регулируемые структурными характеристиками и превосходными адсорбционными свойствами, обусловленными большим объемом пор с разветвленной поверхностью, способной к хемосорбции различных веществ [4], позволяет дополнительно повысить чувствительность анализа. Для создания сенсорного элемента необходимо иммобилизовать на поверхность пористого стекла сенсорный слой, например, методом ковалентного связывания. Адаптация иммунного анализа под формат микрофлюидного устройства дает возможность снизить расход пробы и реагентов, повысить быстроту действия и в перспективе объединить несколько стадий или весь анализ на одном устройстве [5].

Данная статья является развитием работы [6], в которой показана принципиальная возможность создания сенсорного элемента на основе натриевоборосиликатного пористого стекла.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

Иммобилизация белка на натриевоборосиликатное пористое стекло проводится в 5 стадий: 1) предварительный прогрев стекла для удаления сорбированной влаги; 2) активация поверхности; 3) силанизация; 4) обработка глутаральдегидом и 5) непосредственно иммобилизация белка. Принцип функционирования сенсорного элемента основан на конкурентной иммунной реакции, что позволяет исключить стадию связывания образовавшегося иммунного комплекса с флуоресцентной меткой для детектирования:



где IgG — иммобилизованный на пористое стекло иммуноглобулин G, FITC-Ins — меченный изоцианатом флуоресцеина (fluorescein isothiocyanat, FITC) инсулин, Ins — немеченый инсулин, (IgG-Ins-FITC) и (IgG-Ins) — образующиеся меченый и немеченый иммунные комплексы.

В работе использовались реактивы фирмы Sigma Aldrich: белки (иммуноглобулин G, инсулин, бычий сывороточный альбумин) и соли для буферных растворов. Образцы натриевоборосиликатных пористых стекол разработаны и синтезированы в Институте химии силикатов им. В.И. Гребенщикова РАН.

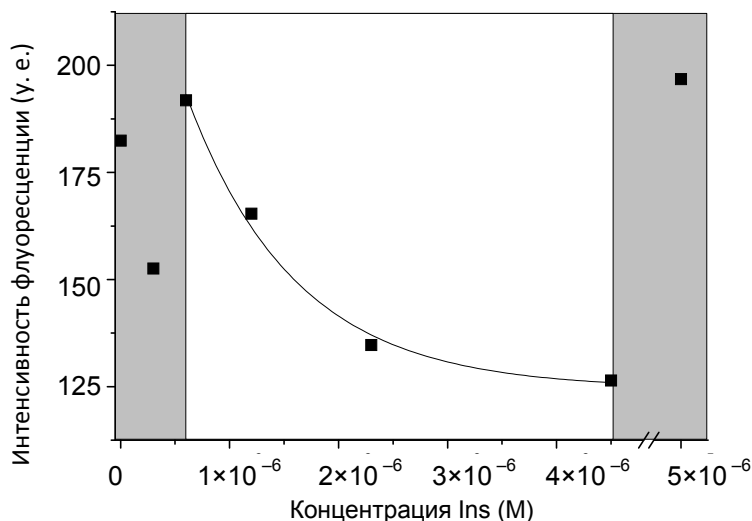


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции сенсорных элементов от концентрации инсулина в пробе на длине волны 528 нм

ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНА В ПРОБЕ

Для обнаружения инсулина в пробе в статическом режиме было создано 17 образцов сенсорных элементов на основе ПС SBS-МАП (средний размер пор, согласно методу БЭТ, ≈ 490 нм, пористость $\approx 50\%$) размером $8 \times 8 \times 0.5$ мм. Концентрация раствора IgG для иммобилизации $C_{\text{IgG}} = 5.7 \cdot 10^{-7}$ М, БСА — 25 мг на образец.

Для контроля воспроизводимости сенсорных элементов (пористого стекла с иммобилизованным IgG) проведены измерения интенсивности флуоресценции образцов в отраженном свете на макете, состоящем из лазера DPBL-9010F (Photop Suttech Inc, Китай) с длиной волны излучения 473 нм, столика для позиционирования образца, рамановского акусто-оптического спектрометра РАОС-1 (НТЦ уникального приборостроения РАН, Россия) и волоконно-оптической системы (далее макет детектора). На полученных зависимостях наблюдался широкий пик флуоресценции глутаральдегида, используемого при иммобилизации белка, с максимумом на длине волны 540 нм. Данные показали, что по уровню флуоресценции сенсорные элементы можно разделить на 2 группы из 12 и 5 образцов: (5020 ± 130) и (4340 ± 150) у.е. Такое разделение образцов позволяет улучшить воспроизводимость измерений. Однако в связи с ограниченным числом образцов иммунная реакция для каждой концентрации аналита проведена на двух образцах из одной группы сенсорных

элементов и на одном из другой, так чтобы учесть вклад, вносимый технологией изготовления в погрешность измерений. Коэффициент вариации (KV) интенсивности флуоресценции на 540 нм составил 2.7 %.

Конкурентная иммунная реакция на сенсорных элементах в статическом режиме осуществлялась в стеклянных бюксах. Для этого сенсорные элементы помещались в реакционную смесь (300 мкл меченого инсулина и 300 мкл инсулина) на 30 мин при температуре 37 °С. Измерения проводились при $C_{\text{FITC-Ins}} = 4.6 \cdot 10^{-6}$ М, для концентраций $C_{\text{Ins}} = 4.6 \cdot 10^{-5}$, $4.6 \cdot 10^{-6}$, $2.3 \cdot 10^{-6}$, $1.2 \cdot 10^{-6}$, $5.7 \cdot 10^{-7}$, $2.8 \cdot 10^{-7}$ и 0 М. На рис. 1 приведены зависимости интенсивности флуоресценции (в отраженном свете) на длине волны 528 нм от концентрации инсулина после проведения иммунной реакции (по 3 образцам), измеренные на спектрофлуориметре HITACHI F-4010 (Япония). Коэффициент вариации (KV) не превышает 7 % для $\lambda = 528$ нм. Приведенные длины волн соответствуют максимумам полученных спектральных зависимостей. На зависимости (рис. 1) наблюдается монотонный участок в диапазоне концентраций от $5.7 \cdot 10^{-7}$ до $4.6 \cdot 10^{-6}$ М, пригодный для проведения анализа. При концентрации аналита, равной концентрации меченого инсулина, интенсивность флуоресценции резко возрастает. Увеличение сигнала при больших концентрациях немеченого инсулина, возможно, связано с увеличением суммарной концентрации и его более плотным размещением на поверхности.

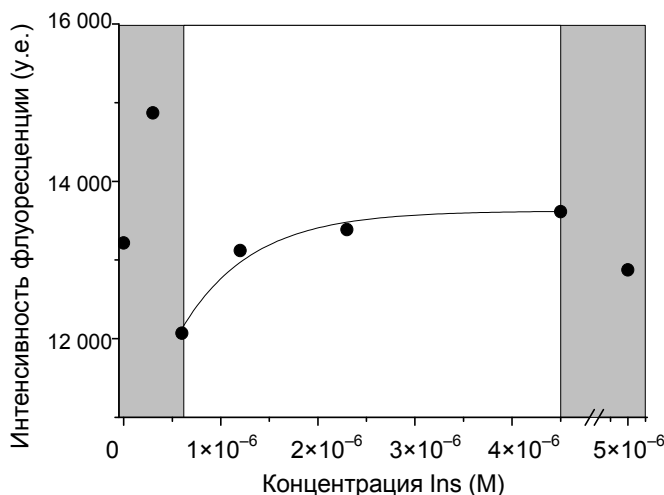


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации инсулина в пробе на длине волны 523 нм

Немонотонный участок с экстремумами также наблюдается при низких концентрациях инсулина.

Экспериментальные зависимости можно аппроксимировать функцией

$$F = F_0 + A(1 - e^{-C/C_0}),$$

где (для длины волны 512 нм) $F_0 = 249.6$ у.е. — интенсивность флуоресценции при отсутствии инсулина в пробе (величина фонового сигнала); C — концентрация аналита; $C_0 = 10^{-6}$ М — характерная концентрация инсулина; $A = -125$ у.е. — коэффициент, зависящий от аппаратной функции прибора. Коэффициент корреляции между экспериментальными значениями и аппроксимирующей функцией составляет 0.997. При $C \ll C_0$ зависимость близка к линейной, коэффициент чувствительности равняется A/C_0 ; при $C \gg C_0$ происходит насыщение.

На рис. 2 приведена аналогичная зависимость, измеренная на макете детектора. Характер зависимости отличается от полученной на спектрофлуориметре. Вероятно, это связано с глубиной проникновения излучения в ПС (область детектируемого слоя). При малой интенсивности возбуждающего излучения аналитический сигнал регистрируется преимущественно с поверхности сенсорного элемента, в этом случае интенсивность флуоресценции возрастает при уменьшении концентрации аналита, что согласуется с теоретическими предпосылками. При использовании в качестве источника возбуждения флуоресценции лазера детектируется сигнал с более

глубоких слоев сенсорного элемента. Величина аналитического сигнала существенно зависит от поглощения и рассеяния меченого и немеченого инсулина в объеме ПС, определяемом в том числе концентрацией аналита. Измерение интенсивности пропускания в проходящем свете позволяет регистрировать интегральный аналитический сигнал на фиксированной толщине сенсорного элемента. Коэффициент вариации аналитического сигнала при детектировании конкурентной реакции по трем измерениям для трех образцов не превышает 2.5 %. В случае проведения реакции только с меченым инсулином KV составляет 6 %.

Зависимость для длины волны 523 нм (рис. 2) также можно аппроксимировать функцией F при $F_0 = 10202$ у.е., $C_0 = 7.25 \cdot 10^{-7}$ М, $A = 3422$ у.е. Коэффициент корреляции между экспериментальными значениями и аппроксимацией составляет 0.987. Используя полученные результаты, можно оценить рабочий диапазон определяемых концентраций инсулина на созданных сенсорных элементах, соответствующий монотонному участку зависимости: $(2.9 \cdot 10^{-7} \div 2.3 \cdot 10^{-6})$ М инсулина в 600 мкл реакционной смеси.

ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНА НА МИКРОФЛЮИДНОМ УСТРОЙСТВЕ

Прототипы микрофлюидного устройства для проведения иммунной реакции представляют собой двухуровневую систему подвода / отвода пробы и реагентов к интегрированному в устройство

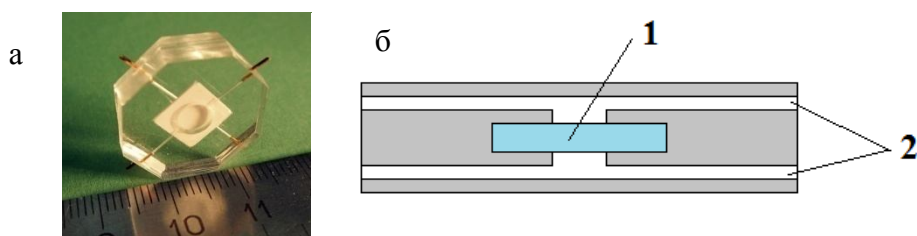


Рис. 3. Изображение прототипа микрофлюидного устройства (а) и его поперечное сечение (б).
1 — сенсорный элемент, 2 — двухуровневая система подвода / отвода пробы и реагентов

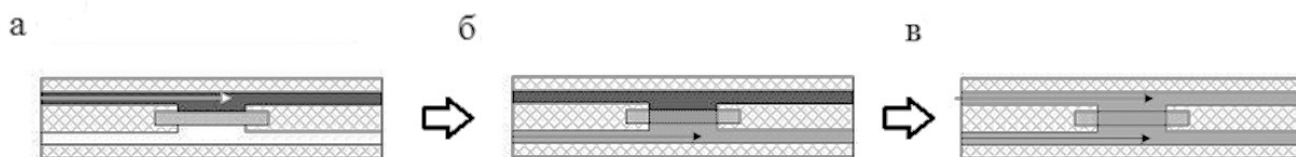


Рис. 4. Схема проведения анализа на МФУ.
а — введение пробы, б — проведение иммунной реакции, в — промывка МФУ

сенсорному элементу на основе пористого стекла (рис. 3) и позволяют проводить иммунный анализ в пробе объемом до 40 мкл. Материалом для МФУ выбран полидиметилсилоксан (Sylgard-184, Dow Corning), поскольку он обладает высоким светопропусканием в видимой области спектра и позволяет оперативно создавать прототипы устройств в условиях исследовательской лаборатории. Сенсорный элемент вклеивается в МФУ при помощи более вязкого силастика Т4 (ООО "Пента Север").

Измерения интенсивности флуоресценции от исходных сенсорных элементов в отраженном свете (концентрация IgG для иммобилизации $C_{\text{IgG}} = 9.2 \cdot 10^{-8}$ М) показали, что полученные образцы следует разделить на 3 группы по интенсивности флуоресценции на длине волны 524 нм: 8450 ± 125 , 9650 ± 140 и 10350 ± 140 у.е.

Концентрация меченого инсулина для проведения иммунной реакции на МФУ составила $C_{\text{FITC-Ins}} = 4.6 \cdot 10^{-6}$ М. Концентрация БСА — 25 мг/образец. Измерения проводились при $C_{\text{Ins}} = 4.6 \cdot 10^{-6}$, $2.3 \cdot 10^{-6}$, $1.2 \cdot 10^{-6}$ и $7.5 \cdot 10^{-7}$ М.

Поскольку результаты исследования массопереноса через пористое стекло показали, что заполнение порового пространства ПС SBS-МАП раствором FITC-Ins происходит примерно за 4 мин, то применялась следующая последовательность операций: верхняя часть устройства заполнялась пробой, а через 5 мин нижняя часть устройства заполнялась буфером (пористая структура уже заполнена пробой) (рис. 4, а). Далее для проведения иммунной реакции МФУ выдерживалось 30 мин

в термостате при температуре 37 °С, в течение которых нижняя часть сенсорного элемента промывалась натрий-фосфатным буферным раствором (PBS) при помощи перистальтического насоса (рис. 4, б). После этого обе стороны МФУ промывались буфером (рис. 4, в), а затем проводились оптические измерения. Общее время анализа, включая стадии заполнения, инкубирования и промывки устройства составило 1 ч 40 мин. Детектирование осуществлялось на макете детектора путем измерения интенсивности флуоресценции находящегося в МФУ сенсорного элемента в проходящем свете. Зависимость интенсивности флуоресценции образцов от концентрации инсулина в пробе после проведения иммунной реакции приведена на рис. 5.

Зависимость аппроксимируется функцией F , при этом: $F_0 = 16111$ у.е., $C_0 = 1.25 \cdot 10^{-6}$ М — характерная концентрация инсулина, $A = 8500$ у.е. Коэффициент корреляции между экспериментальными значениями и аппроксимирующей функцией составляет 0.9994. Аналогичные зависимости также были получены для концентрации $C_{\text{FITC-Ins}} = 4.6 \cdot 10^{-6}$ М по 10 образцам.

Как следует из графиков, увеличение концентрации аналита приводит к повышению интенсивности флуоресценции. Корреляция аппроксимирующей функции и экспериментальных данных для измерений в проходящем свете существенно выше, чем для ранее проведенных измерений на сенсорных элементах в отраженном свете. Это может быть связано с тем, что при детектировании

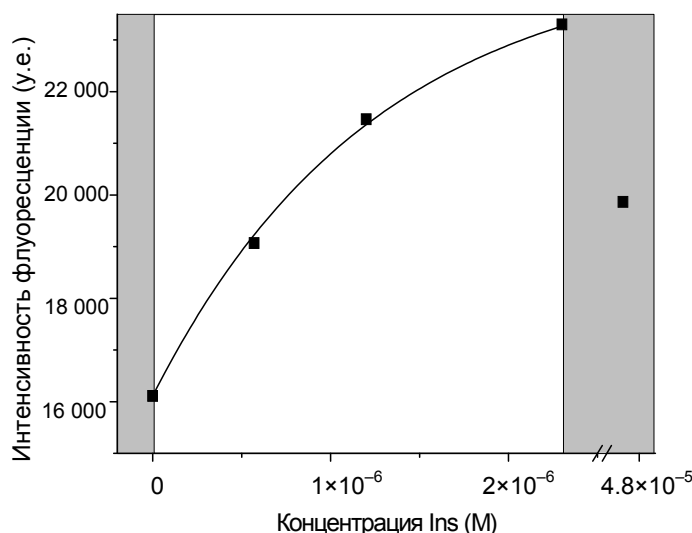


Рис. 5. Градуировочная зависимость при определении инсулина в пробе на МФУ.
 $C_{FITC-Ins} = 4.6 \cdot 10^{-6}$ M. Длина волны измерений 528 нм

в проходящем свете исключается влияние концентрации аналита на глубину детектирования, не учтенное в аппроксимирующей функции.

Вышеприведенные результаты продемонстрировали возможность обнаружения инсулина в диапазоне концентраций ($2.9 \cdot 10^{-7} \div 2.3 \cdot 10^{-6}$) M в 40 мкл реакционной смеси за 1 ч 40 мин.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработан, создан и исследован прототип микрофлюидного устройства с интегрированным сенсорным элементом на основе натриевоборосиликатного стекла SBS-МАП для иммунного анализа.

Совокупность исследований позволила продемонстрировать возможность обнаружения инсулина в диапазоне концентраций ($2.9 \cdot 10^{-7} \div 2.3 \cdot 10^{-6}$) M в 600 мкл пробы на сенсорном элементе в статическом режиме и в 40 мкл пробы в МФУ за 1 ч 40 мин.

При проведении анализа на сенсорном элементе и детектировании результатов иммунной реакции на спектрофлуориметре Hitachi-F4010 и макете детектора получены градуировочные зависимости, противоположные друг другу. Выдвинута гипотеза о том, что величина аналитического сигнала определяется глубиной проникновения возбуждающего излучения (зависящей в том числе от концентрации аналита), неоднородностью распределения иммунного комплекса

по глубине пористого стекла и областью регистрации сигнала флуоресценции. Таким образом, детектирование результата иммунной реакции на пористом стекле в проходящем свете позволило уменьшить влияние данных факторов на аналитический сигнал.

Работа выполнена при поддержке субсидией молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга КНВШ за 2013 г.

Авторы благодарят Цымбалова А.И. за создание мастер-форм для отливки деталей и устройств детектирования и д.ф.-м.н. Буляницу А.Л. за конструктивную критику и терпеливое обсуждение результатов, а также за ряд ценных замечаний и рекомендаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микрофлюидные системы для химического анализа / Под ред. Золотова Ю.А., Курочкина В.Е. М.: Физматлит, 2011. 528 с.
2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
3. Основы аналитической химии. В 2 кн. / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Высшая школа, 1996. 461 с.
4. Антропова Т.В. Физико-химические процессы создания пористых стекол и высококремнеземных материалов на основе ликвирующих щелочноборосиликатных систем. Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. СПб., 2005. 45 с.

5. Lin C.-C., Wang J.-H., Wu H.-W., Lee G.-B. Microfluidic immunoassays // *JALA*. 2010. Vol. 15, nu. 3. P. 253–274.
6. Evstrapov A., Esikova N., Rudnitskaja G., Antropova T. Porous glasses as sensor elements for microfluidic chips // *Optica Applicata*. 2010. Vol. 40, nu. 2. P. 333–340.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург (Есикова Н.А., Евстратов А.А.)*

*Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова
РАН, г. Санкт-Петербург (Антропова Т.В.)*

Контакты: *Есикова Надежда Александровна,
elpis-san@yandex.ru*

Материал поступил в редакцию: 19.12.2013

MICROFLUIDIC DEVICE WITH OPTICAL SENSOR ELEMENT BASED ON SODIUMBOROSILICATE POROUS GLASSES FOR IMMUNE ANALYSIS

N. A. Esikova¹, A. A. Evstrapov¹, T. V. Antropova²

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, RF*

²*Grebenshchikov Institute of Silicate Chemistry of RAS, Saint-Petersburg, RF*

Results of studies on the implementation of a competitive immune analysis on at sodiumborosilicate porous glass SBS-MAP (490 nm average pore size, porosity 50 %) and in a microfluidic device with an integrated sensor element are discussed in the article. The opportunity of insulin detection is demonstrated in concentration range ($2.9 \cdot 10^{-7}$ – $2.3 \cdot 10^{-6}$) M at sensor element in sample volume 600 μ l and in microfluidic device with sensor element in sample volume 40 μ l.

Keywords: microfluidic device, competitive immune analysis, sodiumborosilicate porous glass

REFERENCES

1. Lin C.-C., Wang J.-H., Wu H.-W., Lee G.-B. Microfluidic immunoassays. *JALA*, 2010, vol. 15, nu. 3, pp. 253–274.
2. Evstrapov A., Esikova N., Rudnitskaja G., Antropova T. Porous glasses as sensor elements for microfluidic

chips. *Optica Applicata*, 2010, vol. 40, nu. 2, pp. 333–340.

Contacts: *Esikova Nadezhda Aleksandrovna,
elpis-san@yandex.ru*

Article arrived in edition: 19.12.2013