

# Иммуносенсорные системы с флуоресцентной регистрацией на основе ленгмюровских пленок

Г.К.Чудинова, И.А.Наговицын, Р.Е.Карпов, В.В.Савранский

*Разработан метод определения белковых антигенов для флуоресцентного иммуноанализа с помощью модельной системы, сформированной на основе методики приготовления ленгмюровских пленок. В качестве маркеров для регистрации связывания антигена на поверхности ленгмюровских пленок антител были использованы флуоресцеинизотиоцианат и ранее не исследованные донорно-акцепторные пары маркеров с переносом энергии: Yb-комплекс тетрафенилпорфирина – бензоилтрифторацетонизотиоцианат и производное тетра(карбоксифенил)порфирина – цианиновый краситель, содержащий пятичленную полиеновую цепь. Регистрацию проводили в ближнем ИК диапазоне (для первой пары) и в видимом диапазоне спектра (для второй пары). Для снижения неспецифической сорбции белка (антигена) был предложен метод создания неполярной поверхности при нанесении в качестве подложки четного числа слоев стеариновой кислоты в пленке Ленгмюра – Блуджетт. Достигнута высокая чувствительность модельных систем к белковому антигену в растворе – до  $10^{-11}$  М; при этом время, требуемое для анализа, составляло 6–8 мин. Модельная система с первой донорно-акцепторной парой была апробирована при анализе плазмы крови. Впервые исследована сенсibilизированная дикетонатными комплексами лантаноидов флуоресценция  $Dy^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$  и  $Yb^{3+}$ -комплексов тетрафенилпорфирина и показана возможность усиления ИК флуоресценции этих комплексов в ленгмюровской пленке.*

**Ключевые слова:** флуоресцентный резонансный перенос энергии, флуоресцентный иммуноанализ, иммуносенсоры, биосенсоры, пленки Ленгмюра – Блуджетт, лантаноиды, порфирины, цианиновые красители, сывороточный альбумин.

## 1. Введение

В последнее десятилетие наблюдается повышенный интерес к разработке высокоэффективных устройств для медицинского и экологического мониторинга. При этом особенно важным является получение простых в употреблении хемо- и биосенсоров на опасные инфекции, наркотические и отравляющие вещества [1–9]. Использование систем с флуоресцентной регистрацией и флуоресцентный иммуноанализ – один из наиболее перспективных и активно развивающихся методов. В связи с этим актуален поиск более эффективных маркеров и методик регистрации флуоресцентного сигнала. Поиску таких маркеров, улучшенных способов иммобилизации антител и способов усиления флуоресценции маркера посвящено большое число работ (см., напр., [1, 2, 10, 11]).

Главное ограничение уже имеющихся иммуносенсоров – большая фоновая флуоресценция белков и других биологических объектов. Она является причиной больших ошибок измерений и обусловлена в основном неспецифическим связыванием биологических аналитов с полярной поверхностью субстрата. Критерием эффективности сенсорного элемента служит отношение полезного сигнала (интенсивности флуоресценции маркера) к фоновому.

Итак, задачей нашего исследования было создание модельной системы сенсорного устройства с высокой чувствительностью на основе простой и дешевой методики приготовления пленок и несложной процедуры проведения анализа. Обсуждаются используемые нами способы увеличения интенсивности флуоресценции маркера и снижения фоновой флуоресценции.

Для создания чувствительных систем применялась методика ленгмюровских пленок, которая позволяет получать высокоупорядоченные монослои антител на поверхности водной субфазы и переносить их на твердые подложки. Нами был предложен метод иммобилизации антител (иммуноглобулинов IgG), заключающийся в перенесении на подложку белково-липидного монослоя, практически нерастворимого в воде. Данный подход позволяет избежать ковалентной сшивки IgG с подложкой, что значительно удешевляет приготовление модельной системы.

Известно, что создание упорядоченного окружения приводит к росту эффективности флуоресценции [12]. В ленгмюровской пленке, представляющей собой двумерную высококооперативную упорядоченную систему, возможно значительное увеличение интенсивности собственной флуоресценции маркера и, следовательно, увеличение чувствительности сенсорного элемента. Дальнейшего усиления флуоресценции маркера можно достичь за счет флуоресцентного резонансного переноса энергии с маркера-донора на маркер-акцептор. В наших исследованиях впервые применялись новые донорно-акцепторные пары маркеров: бензоилтрифторацетонизотиоцианат (bta) (донор) – Yb-комплекс тетрафенилпорфирина (YbTRP) (акцептор) [13]; производное тетра(карбоксофенил)порфирина (МАТСРР) (донор) – цианиновый кра-

Г.К.Чудинова, И.А.Наговицын, В.В.Савранский. Центр естественнонаучных исследований Института общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38  
Р.Е.Карпов. Центр фотохимии РАН, Россия, 117421 Москва, ул. Новаторов, 7

ситель (Cu5) (акцептор) [14]. При использовании в качестве маркера YbTPP регистрация проводится в ближней ИК области, где полностью отсутствует собственная флуоресценция белка.

Нами предложен метод приготовления гидрофобной рабочей поверхности путем нанесения четного числа монослоев стеариновой кислоты в качестве подложки и показано, что таким образом можно значительно снизить неспецифическую сорбцию. При использовании перечисленных подходов возможно создание систем с высокой чувствительностью к антигену в растворе (до  $10^{-11} - 10^{-16}$  М (1 М = 1 моль/л)) и малым временем анализа (6–8 мин).

Полученные результаты представляют самостоятельный интерес с точки зрения фундаментальной науки. Научная сторона проблемы касается изучения механизма переноса энергии в конденсированных средах, т. к. в литературе неоднократно описаны факты, указывающие на неоднозначное соответствие теории Ферстера и процессов безызлучательного переноса энергии в конденсированных средах [15, 16].

Направление исследований, результаты которых приведены в настоящей статье, было поддержано академиком Александром Михайловичем Прохоровым. Статья является обзором работ, выполненных под его непосредственным руководством.

## 2. Методы и материалы

В качестве маркеров с флуоресценцией в ИК диапазоне спектра использовались лантаноидные комплексы ( $\text{Ln} = \text{Dy}^{3+}, \text{Tm}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ ) 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (DyTPP, TmTPP, YbTPP), синтезированные В.Д. Румянцевой (Московская государственная академия тонкой химической технологии (МГАТХТ) им. М.В.Ломоносова) на основании методики, опубликованной в работе [17]. Маркеры с активными группами для ковалентного связывания с белком, 5-{4-карбамоил[2-аминоэтил(4-аминобензил)]фенил}-10,15,20-трис(4карбокисфенил)порфирин (МАТСПР), бензоилтрифторацетонизотиоцианат (bta) и гидроксисукцинимидный эфир 1-(5'-карбокисептил)-1''этил-3, 3', 3'-тетраметилендокарбонцианин иодида (Cu5), были предоставлены А.В.Чудиновым (Институт молекулярной биологии (ИМБ) им. В.А.Энгельгардта РАН). Конъюгаты IgG с МАТСПР и бычий сывороточный альбумин (BSA) с Cu5 получали по методикам работ [18–20]. Использовались флуоресценциотиоцианат (FITC), стеариновая кислота (SA) и липид (L- $\alpha$ -фосфатидилхолин дипальмитоил) (Sigma, США), кроличьи антитела (IgG), специфические к человеческому сывороточному альбумину (HSA) (НИИ вакцин и сывороток им. Н.И.Мечникова РАМН), BSA и специфические к нему иммуноглобулины мыши (Институт вирусологии РАМН).

Пленки приготавливались на установке Joyce Loeb (Великобритания). Субфазу готовили на основе тридистиллированной воды. Монослой смеси DyTPP–SA готовили на субфазе следующего состава: на 5 л тридистиллята – 0.03 г  $\text{NaHCO}_3$  и HCL до pH = 8.0; 0.05 г  $\text{NaN}_3$ . Во всех остальных случаях использовали раствор KCl с концентрацией 0.05 М (на 5 л тридистиллята – 18.65 г KCl и 0.05 г  $\text{NaN}_3$ ).

Нанесение монослоя антител проводили в смеси с L- $\alpha$ -фосфатидилхолин дипальмитоилом. Стабильность

монослоя белково-липидных комплексов в водной среде значительно выше, чем монослоя, содержащего только белок. Отличительной чертой применяемой методики является модификация подложки с помощью нанесения пленок Ленгмюра – Блоджетт жирных кислот. Это приводит к сглаживанию микродефектов подложки и модификации поверхности – получению полярной и неполярной поверхностей. Формирование неполярной поверхности позволяет значительно снизить неспецифическое связывание антигенов.

Приготовление иммуночувствительных систем и методика измерения флуоресцентного отклика описаны в [13, 21]. В качестве подложек использовали кварцевые пластинки ( $35 \times 10 \times 1$  мм), на которые предварительно наносили 10 или 11 слоев стеариновой кислоты методом Ленгмюра – Блоджетт при поверхностном давлении 30 мН/м. После нанесения белково-липидного монослоя или монослоя смеси LnTPP–SA получали неполярную (гидрофильную) или полярную (гидрофобную) поверхность. Белково-липидные монослои и монослои LnTPP–SA переносили на подложки методом Ленгмюра – Шеффера (метод касания) при поверхностном давлении 15–17.5 и 22.5 мН/м соответственно. Растворы готовили в хлороформе в соотношении LnTPP:SA = 1:1 (исходные концентрации  $10^{-3}$  М).

Пластинки с монослоями смеси LnTPP–SA выдерживали в усиливающих растворах, измеряя спектры флуоресценции в диапазоне 900–1100 нм через 2, 4, 6 и 8 мин. Усиливающие растворы содержали ацетилацетонаты Ln, теноилтрифторацетон (ТТА) с концентрацией, на два порядка большей концентрации Ln, и поливиниловый спирт. Исходный раствор содержал ТТА с концентрацией  $10^{-2}$  М и поливиниловый спирт с массовой концентрацией 0.02 %. Растворы с меньшей концентрацией готовили последовательным разбавлением и использовали через сутки.

При расчетах использовалась относительная интегральная интенсивность флуоресценции  $S/S_0$ , где  $S$  и  $S_0$  – площади под кривой спектра флуоресценции в момент времени  $t$  и до начала выдерживания в усиливающих растворах. Кривые были построены в координатах  $S/S_0$  – концентрация донора и в координатах Штерна – Фольмера (тушение  $S_0/S$  – концентрация донора) [22]. Константа скорости изменения интегральной интенсивности флуоресценции рассчитывалась по уравнению кинетики первого порядка для первых восьми минут реакции. Для изготовления рисунков применялась компьютерная программа Microcal Origin v.5.0. Обработка зависимостей, представленных на всех рисунках, кроме рис.2, осуществлялась методом интерполяции «spline», а зависимостей на рис.2 (в силу разброса данных) – методом «b-spline».

Измерение спектров флуоресценции проводилось на спектрофлуориметрах Shimadzu RF-5000 и Hitachi 850. Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометрах Shimadzu UV-VIS 3100 и Hitachi 330.

## 3. Результаты и их обсуждение

Создание ленгмюровских монослоев водорастворимых белковых веществ представляет определенную проблему. В связи с этим нами были проведены исследования поведения различных белков на поверхности водной субфазы. Показано, что возможно создание стабильных во времени, упорядоченных монослоев при использова-

нии субфазы необходимого ионного состава; при этом за счет эффекта высаливания белок не растворяется в объеме субфазы [23].

Чувствительная система была апробирована с использованием FITC в качестве маркера для IgG кролика, специфичного к HSA. При проведении реакции антиген – антитело на поверхности ленгмюровской пленки была получена близкая к линейной зависимость изменения интенсивности флуоресценции от концентрации немаркированного HSA в растворе в интервале концентраций  $10^{-6}$  –  $10^{-12}$  М (рис. 1, а). На рис. 1, б показано влияние концентрации неспецифического антигена – BSA. Линейная калибровочная зависимость удобна в первую очередь тем, что позволяет однозначно интерпретировать отклик сенсорного элемента. В данном случае регистрацию флуоресценции проводили в видимой области. В пленках маркированного IgG(FITC) было обнаружено явление удвоенной флуоресценции: появление двух полос с максимумами на  $\lambda = 500$  и  $575$  нм вместо полосы с максимумом на  $\lambda = 525$  нм, характерной для IgG(FITC) в растворе [21].

Автофлуоресценция белков в видимой области является одним из основных факторов, снижающих чувствительность во флуоресцентном иммуноанализе. В дальней красной (600–850 нм) и ближней ИК (920–1000 нм) областях спектра практически отсутствует фоновая флуоресценция белков. Было высказано предположение, что использование ИК флуоресцентных маркеров позволит увеличить чувствительность и селективность анализа. В качестве маркера был выбран YbTPP. Иттербиевые комплексы порфиринов имеют интенсивную полосу флуоресценции в области  $\lambda = 975$  нм, однако в водной среде интенсивность флуоресценции незначительна и квантовый выход YbTPP в ИК области составляет порядка  $10^{-4}$  [12, 24].

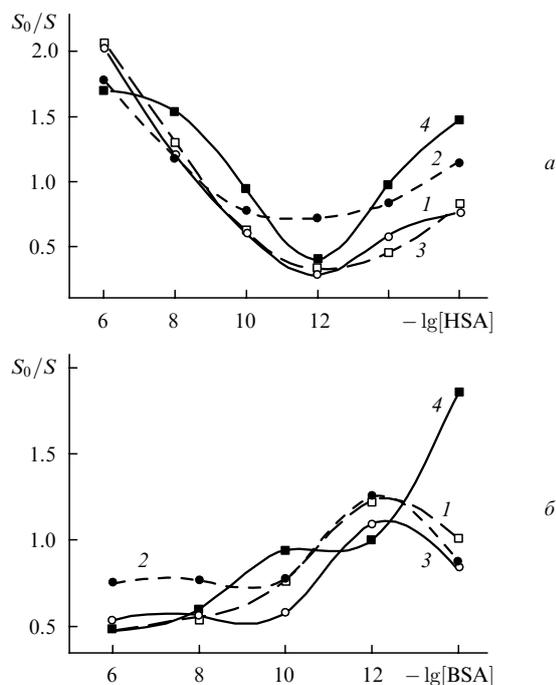


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции в координатах Штерна – Фольмера при реакции антиген – антитело на поверхности монослоя IgG(FITC) при взаимодействии со специфическим (HSA) (а) и неспецифическим (BSA) (б) антигенами в течение 2 (1), 4 (2), 6 (3) и 8 мин (4).

Усилить сигнал флуоресценции можно с помощью синтеза новых комплексов – эффективных сенсibilизаторов флуоресценции, введения комплекса Ln в систему, обладающую более высокой степенью упорядоченности и использования сенсibilизации флуоресценции метки посредством переноса энергии (в случае взаимодействия комплексов лантаноидов усиление флуоресценции одного из лантаноидов называется эффектом кофлуоресценции).

Из литературы известно, что изменение окружения Yb-комплекса порфирина с водного на водно-липосомальный приводит к сужению полосы и увеличению интенсивности флуоресценции в 1.5 раза [12]. В работах по сенсibilизации флуоресценции [25–30] показана возможность увеличения интенсивности флуоресценции комплексов Ln, в основном комплексов  $\text{Eu}^{3+}$ , именно в ленгмюровских пленках. Однако перечисленные работы касаются прежде всего флуоресценции в видимом диапазоне спектра. Отмечено, что усиливающее действие оказывают комплексы Ln со слабой ионной флуоресценцией, например комплексы  $\text{Y}^{3+}$  [26]. Энергия с лиганда усиливающего иона передается на лиганд иона  $\text{Eu}^{3+}$  и с триплетного уровня лиганда  $\text{Eu}^{3+}$  на ион  $\text{Eu}^{3+}$ .

Нами впервые была исследована собственная флуоресценция LnTPP и их кофлуоресценция под воздействием теноилтрифторацетонатов Ln ( $\text{Ln}(\text{TfA})_3$ ) в ленгмюровских пленках. Показано, что введение комплекса порфирина с лантаноидами в слой Ленгмюра – Блуджетт позволяет увеличить интенсивность его флуоресценции в 3–3.5 раза по сравнению с таковой в растворе, а использование сенсibilизации флуоресценции LnTPP теноилтрифторацетонатными комплексами других лантаноидов приводит к увеличению интенсивности флуоресценции Ln приблизительно на порядок относительно интенсивности флуоресценции раствора и в 1.4–8 раз относительно интенсивности собственной флуоресценции LnTPP в пленке в отсутствие  $\text{Ln}(\text{TfA})_3$  [31–33].

Установлено, что флуоресценция пленок LnTPP в ИК диапазоне определяется в значительной степени флуоресценцией TPP-лиганда. По литературным данным интенсивность и форма спектров Ln-комплексов порфиринов зависят от температуры и структуры порфиринового лиганда [12, 34]. Наблюдаемая нами форма спектров LnTPP в пленках сходна с таковой для растворов Yb-комплекса тетраакс(*p*-гидроксифенил)порфирина при комнатной температуре [34].

Спектры флуоресценции YbTPP, DyTPP, TmTPP и безметалльного TPP в пленках в области 900–1100 нм имеют одну уширенную полосу с максимумом на  $\lambda = 978, 952, 960$  и  $970$  нм соответственно. Можно предположить, что в нашем случае ионы лантаноидов играют такую же роль, как и примесные центры кристаллов, на которых происходит дезактивация электронного возбуждения. Это подтверждается тем, что наибольшее усиление достигается, если концентрация усиливающего комплекса приблизительно на 2–4 порядка больше концентрации LnTPP в пленке; последняя составляла  $10^{-10}$  М. Кроме того, было обнаружено, что усиление ИК флуоресценции TmTPP и DyTPP определенно зависит от соотношения ионных радиусов Ln в комплексах LnTPP и  $\text{Ln}(\text{TfA})_3$  (рис. 2 и 3). Наибольшее усиление в  $\sim 2$  и  $8$  раз достигается в случае  $\text{Y}(\text{TfA})_3$  и  $\text{Tm}(\text{TfA})_3$  для TmTPP и DyTPP соответственно. Флуоресценция безметалльного TPP усиливается в 1.4–2.8 раза под действием комплек-

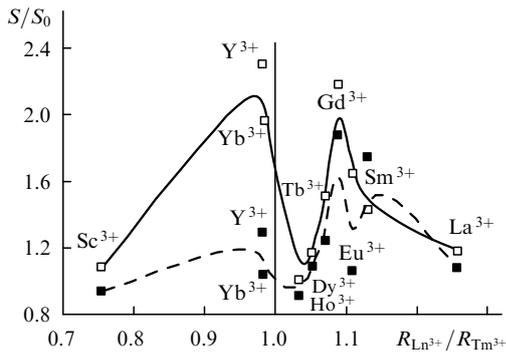


Рис.2. Изменение относительной интегральной интенсивности флуоресценции TmTPP под действием Ln(TTA)<sub>3</sub> в зависимости от отношения  $R_{Ln^{3+}}/R_{Tm^{3+}}$  ионных радиусов Ln<sup>3+</sup> и Tm<sup>3+</sup> для полярной (сплошная кривая) и неполярной (штриховая кривая) поверхностей при концентрации Ln(TTA)<sub>3</sub>, равной 10<sup>-5</sup> М. Флуоресценция возбуждалась светом с  $\lambda = 330$  нм (поглощение ТТА).

сонатов лантаноидов.

Для YbTPP наблюдалось наименьшее усиление ИК флуоресценции, которое не превышает 1.2–1.4 раза; причем максимальное усиление, в отличие от предыдущих случаев, достигается в области концентраций, сравнимых с концентрацией порфиринового комплекса в пленке и меньших нее. Это можно объяснить сильной собственной флуоресценцией иона Yb<sup>3+</sup>: он эффективно тушит возбужденное состояние ТРР посредством внутримолекулярного переноса энергии, в результате чего незначительно возрастает интегральная интенсивность флуоресценции.

Таким образом, показана принципиальная возможность значительного усиления ИК флуоресценции редкоземельных комплексов порфиринов посредством переноса энергии с  $\beta$ -дикетонатных соединений – доноров энергии. Поскольку маркирование редкоземельными ТТА-комплексами белков, участвующих в иммунореакции, представляет собой определенную трудность, было решено использовать безметалльный bta и YbTPP в качестве маркеров для антигенов и антител соответственно.

Результаты исследований чувствительной иммуносенсорной системы с переносом энергии от bta на YbTPP представлены в работе [13]. Как и в [21], исполь-

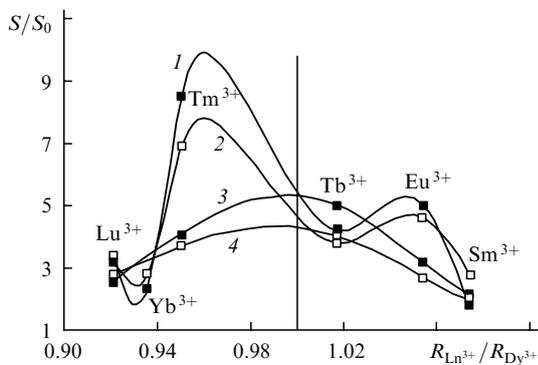


Рис.3. Изменение относительной интегральной интенсивности флуоресценции DyTPP в области 900–1100 нм под воздействием Ln(TTA)<sub>3</sub> в зависимости от отношения  $R_{Ln^{3+}}/R_{Dy^{3+}}$  ионных радиусов для неполярной (1, 3) и полярной (2, 4) поверхностей при концентрации Ln(TTA)<sub>3</sub> в усиливающем растворе 10<sup>-5</sup> (1, 2) и 10<sup>-7</sup> М (3, 4). Флуоресценция возбуждалась светом с  $\lambda = 330$  нм (поглощение ТТА).

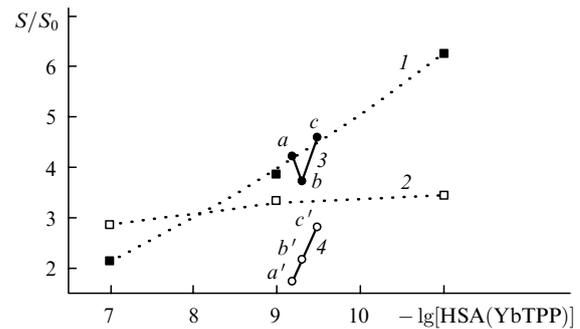


Рис.4. Изменение интегральной интенсивности флуоресценции HSA(YbTPP) в слое Ленгмюра–Блоджетт (пунктирные линии) и влияние неспецифического антигена BSA (сплошные линии; сорбция белков проводилась из смеси состава HSA(YbTPP):BSA = 1:2 (a, a'), 1:1 (b, b') и 2:1 (c, c') при исходной концентрации компонентов смеси 10<sup>-9</sup> М) для неполярной (1, 3) и полярной (2, 4) поверхностей. Флуоресценция возбуждалась светом с  $\lambda = 330$  нм.

зовались поликлональные антитела – IgG кролика, специфичные к антигену – HSA, однако предлагаемую в настоящей работе систему можно применять для определения не только сывороточного альбумина, но и других антигенов белковой и небелковой природы, иммобилизуя в ленгмюровской пленке специфичные к ним антитела.

Критериями эффективности сенсорной системы является ее чувствительность к различным концентрациям специфических антигенов и незначительный отклик при связывании неспецифических антигенов. На рис.4 показаны калибровочные кривые сенсорной системы – зависимости усиления интегральной интенсивности флуоресценции сорбированного на поверхности пленки HSA(YbTPP) от его исходной концентрации в растворе (пунктирные линии). Сплошные линии – относительные интегральные интенсивности  $S/S_0$ , полученные в экспериментах с добавлением неспецифического антигена – BSA. Видно, что система с неполярной рабочей поверхностью (кривая 1) обладает большей чувствительностью, чем система с полярной поверхностью (кривая 2), т. е. большим различием  $S/S_0$  для разных концентраций определяемого антигена. Избирательность к специфическому антигену также значительно выше для кривой 1, т. к. значения  $S/S_0$  для опытов с добавлением BSA и без него практически совпадают. Близкие значения  $S/S_0$  на кривой 2, полученные для разных концентраций HSA(YbTPP), можно объяснить высокой степенью неспецифического связывания – сорбцией полярных молекул альбумина на полярных «головках» липида.

Сходные результаты получены в плазме крови человека (рис.5). Поскольку в реальных физиологических жидкостях приходится определять немаркированный антиген, в эксперименте использовались пленки смеси IgG–липид с заранее сформированным комплексом антитело (IgG(bta))–антиген (HSA(YbTPP)). Для этого пластинку выдерживали в течение 6 мин в растворе HSA(YbTPP) с концентрацией 10<sup>-9</sup> М, что приводило к усилению флуоресценции в ИК области. Затем ее помещали в плазму, содержащую немаркированный HSA с заданной концентрацией. В процессе выдерживания немаркированный HSA конкурентно связывается с антителом, и по изменению интенсивности флуоресценции можно судить о концентрации HSA в плазме крови. Изменение интенсивности для полярной поверхности (кри-

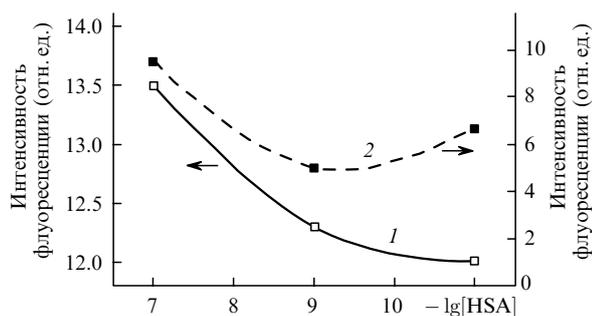


Рис.5. Отклик чувствительной системы в плазме крови в зависимости от концентрации немаркированного HSA (специфический антиген) для неполярной (1) и полярной (2) поверхностей. Флуоресценция возбуждалась светом с  $\lambda = 330$  нм.

вая 2) значительно меньше, чем для неполярной (кривая 1). Это говорит о том, что именно на неполярной поверхности неспецифическое связывание минимально. Меньшее изменение интенсивности флуоресценции для более низких концентраций определяемого HSA вполне логично объясняется тем, что большая часть маркированного HSA (YbTPP) остается связанной с монослоем IgG.

В настоящее время одной из основных проблем является поиск новых эффективных маркеров для биологических методов анализа. Ищутся новые соединения, которые могли бы служить маркерами на ДНК и белки [10, 35], причем использование донорно-акцепторных пар с переносом энергии является весьма эффективным способом маркирования [2, 36–38].

В работе [14] нами была сделана попытка увеличить полезный сигнал для флуоресцентного анализа с переносом энергии, используя впервые предлагаемую донорно-акцепторную пару маркеров порфирин–цианиновый краситель. Маркерами являлись Cu5 и МАТСРР. В данном случае антиген (BSA) маркировали цианиновым красителем, а антитело (IgG мыши) – порфириновым. В пленках наблюдался перенос энергии от МАТСРР (донор) на Cu5 (акцептор) в процессе образования комплекса антиген–антитело. Обнаружено, что эффективность переноса энергии в ленгмюровских упорядоченных монослоях в 1.5–2 раза выше, чем в растворах.

На рис.6 приведены калибровочные кривые для чувствительной системы с парой маркеров МАТСРР–Cu5. Отклик (константа скорости изменения интегральной интенсивности флуоресценции в течение времени ана-

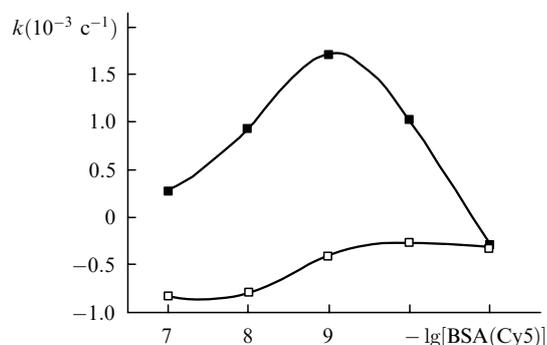


Рис.6. Отклик для полярной (■) и неполярной (□) поверхностей – зависимости константы скорости изменения интегральной интенсивности флуоресценции  $k$  от концентрации маркированного антигена BSA(Cy5) в растворе. Флуоресценция возбуждалась светом с  $\lambda = 410$  нм (полоса Соре МАТСРР).

лиза) на полярной поверхности изменяется по параболическому закону с максимумом при концентрации антигена  $10^{-9}$  М, а на неполярной поверхности он имеет S-образную форму и почти в 10 раз ниже. Различие констант скоростей изменения интенсивности можно объяснить большим количеством BSA(Cy5), находящегося на поверхности в результате неспецифического связывания с полярными группами липида.

Как и в работе [21], модельная система с маркерами порфирин–цианиновый краситель чувствительна к антигену и в области его более низких концентраций. Кривая отклика в области концентраций BSA(Cy5), равных  $10^{-12}$  –  $10^{-14}$  М, представляет собой прямую линию, причем отклик больше в области более низких концентраций [14]. В этом случае молекулы BSA(Cy5) могут быть аналогами примесных центров, на которых происходит дезактивация возбуждения в упорядоченной ленгмюровской пленке.

#### 4. Заключение

В работе описаны результаты исследований по созданию чувствительных систем на основе ленгмюровских пленок для флуоресцентного иммуноанализа. Нами впервые предложены метод модификации поверхности подложки путем нанесения слоев Ленгмюра – Блоджетт стеариновой кислоты для получения поверхности с разной полярностью, а также метод иммобилизации антител в виде белково-липидных комплексов в монослое, позволяющий избежать использования ковалентной пришивки антител. Определена чувствительность сформированной таким образом модельной системы к немаркированному антигену (HSA) при использовании FITC в качестве маркера для антитела. Чувствительность системы к антигену в растворе составляла не менее  $10^{-12}$  М.

Впервые исследована сенсбилизация флуоресценции LnTPP в ленгмюровских пленках под воздействием Ln(TTA)<sub>3</sub> и показано, что возможно усиление ИК флуоресценции LnTPP в 1.4–8 раз. Это усиление зависит от соотношения ионных радиусов лантаноидов в порфириновом комплексе и в комплексе с TTA.

Пара маркеров с переносом энергии YbTPP – bta применялась для маркирования антигена и антитела соответственно. Флуоресценцию регистрировали в ближнем ИК диапазоне (максимум на  $\lambda = 975$  нм). Чувствительность системы равна  $10^{-11}$  М. Для регистрации в видимом диапазоне спектра использовалась другая пара маркеров с переносом энергии: МАТСРР–Cu5 для маркирования антитела и антигена соответственно. Чувствительность составляла  $10^{-11}$  М.

Пары маркеров с переносом энергии применялись впервые.

Чувствительность предлагаемых сенсорных систем превышает чувствительность таких хорошо известных методов, как, например, ELISA, который дает возможность определять концентрацию белков порядка  $10^{-9}$  М [39]. Время анализа в нашем случае равно 6–8 мин, тогда как анализ методом ELISA требует до 2 ч.

Представленные результаты показывают перспективность выбранного направления исследований для практического применения. Предлагаемые нетрудоёмкие методики позволяют снизить время анализа, повысить его чувствительность и селективность, а также значительно уменьшить неспецифическое связывание.

Работа поддержана грантом № 00-15-96559 Ведущих научных школ РФ.

Авторы искренне благодарят за помощь в работе В.Д.Румянцеву (МГАТХТ им. М.В.Ломоносова), А.В.Чудинова (ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН), Г.Г.Комиссарова и А.В.Лобанова (Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН).

1. Sheikh S.H., Abela V.A., Mulchandani A. *Anal. Biochem.*, **283**, 33 (2000).
2. Grant S.A., Xu J., Bergeron E.J., Mroz J. *Biosensors & Bioelectronics*, **16**, 231 (2001).
3. Kaiser T., Gudat P., Stock W., Pappert G., Grol M., Neumeier D., Lippa P.B. *Anal. Biochem.*, **282**, 173 (2000).
4. Vo-Dinh T., Sepaniak M.J., Griffin G.D., Alarie J.P. *Immuno-methods*, **3**, 85 (1993).
5. Simonian A.L., Grimsley J.K., Flounders A.W., Schoeniger J.S., Cheng T.-C., De Frank J.J., Wild J.R. *Anal. Chim. Acta*, **442**, 15 (2001).
6. Madou M., Joseph J. *Immuno-methods*, **3**, 134 (1993).
7. Mullett W.M., Lai E.P.C., Yeung J.M. *Methods*, **22**, 77 (2000).
8. Волков С.К. *Успехи химии*, **63** (1), 93 (1994).
9. Еремин С.А., Самсонова Ж.В., Егоров А.М. *Успехи химии*, **63** (7), 638 (1994).
10. Савицкий А.П. *Успехи биологической химии*, **31**, 209 (1990).
11. Garcinuco R.M., Fernandez P., Perez-Conde C., Gutierrez A.M., Samara C. *Talanta*, **52**, 825 (2000).
12. Гайдук М.И., Григорьянц В.В., Миронов А.Ф., Румянцева В.Д., Ройтман Л.Д. *ЖПС*, **46** (1), 163 (1986).
13. Наговицын И.А., Чудинова Г.К. *ДАН*, **282** (2), 267 (2002).
14. Чудинова Г.К., Наговицын И.А., Чудинов А.В., Савранский В.В., Прохоров А.М. *ДАН*, **282**, 404 (2002).
15. Векшин Н.Л. *Фотоника биологических структур* (Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1988).
16. Ester T.N., Thompson T.E. *Biophys. J.*, **26**, 195 (1979).
17. Wong C.-P., Venteicher R.F., Horrocks W. *J. Am. Chem. Soc.*, **96** (22), 7149 (1974).
18. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. *Теория и практика иммуноферментного анализа* (М.: Высшая школа, 1991, с. 286).
19. Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Waggoner A.S. *Cytometry*, **10**, 11 (1989).
20. Schobel U., Egelhaaf H.-J., Fröhlich D., et. al. *J. Fluorescence*, **10**, 147 (2000).
21. Chudinova G., Chudinov A., Savransky V., Prokhorov A. *Thin Solid Films*, **307**, 294 (1997).
22. Лакович Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии* (М: Мир, 1986, с. 496).
23. Chudinova G.K., Pokrovskaya O.N., Savitsky A.P. *Russ. Chem. Bull.*, **44**, 1958 (1995).
24. Tsvirko M.P., Stelmakh G.F., Pyatosin V.E., Solovyov K.N., Kachura T.F. *Chem. Phys. Lett.*, **73** (1), 80 (1980).
25. Xu Y.Y., Hemmila I., Mikkala V.-M., Holttinen S., Lovgren T. *Analyst*, **116**, 1155 (1991).
26. Zhong C., Feng Y., Yang K., Zhu G. *Chemistry Lett.*, **25** (8), 775 (1996).
27. Zhong G.-L., Yang K.-Z. *Langmuir*, **14**, 5502 (1998).
28. Yang Y., Su Q., Zhao G. *J. Molecular Structure*, **525**, 47 (2000).
29. Zhang R.-J., Yang K.-Z. *Thin Solid Films*, **371**, 235 (2000).
30. Zhang R.-J., Yang K.-Z., Yu A.-C., Zhao X.-S. *Thin Solid Films*, **363**, 275 (2000).
31. Chudinova G., Rumiantseva V., Chudinov A. *Proc. European Conf. on Thin Organized Films* (Potsdam, Germany, 1998).
32. Chudinova G., Rumiantseva V., Nagovitsyn I. *Book of Abstracts VIII Intern. Conf. on Spectroscopy and Chemistry of Porphyrins and their Analogs* (Minsk, Republic of Belarus, 1998, p. 81).
33. Наговицын И.А., Чудинова Г.К., Румянцева В.Д., Лобанов А.В. *Тезисы докл. VI Междунар. конф. «Научно-технические технологии»* (М., Россия, 1999, с. 208–209).
34. Meng J.X., Li K.F., Yuan J., Zhang L.L., Wong W.K., Cheah K.W. *Chem. Phys. Lett.*, **332**, 313 (2000).
35. Glazer A., Benson S. *Biotechnol. Advances*, **13**, 575 (1995).
36. Mitsui T., Nakano H., Yamana K. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2605 (2000).
37. Youn H.J., Terpetschnig E., Szmecinski H., Lakowicz J.R. *Anal. Biochem.*, **232**, 24 (1995).
38. Tolosa L., Malak H., Raob G., Lakowicz J.R. *Sensors and Actuators B*, **45**, 93 (1997).
39. *Иммуно-ферментный анализ*. Под ред. Т.Т.Нго, Г.Ленхоффа (М.: Мир, 1988).