Имуноанализ с колоидни златни наночастици за определяне на ниски концентрации на прогестерон

Цветомира Иванова, Недялка Димова, Цонка Годжевъргова

Immunoassay with colloidal gold nanoparticles for determination of low concentrations of progesterone. *A sensitive immunoassay by using of colloidal gold nanoparticles for determination of progesterone was developed. The preparation of progesterone-3(O-carboxymethyloxime)-bovine serum albumin conjugate (Prog-3-CMO-BSA) was achieved by carbodiimide method. The optimal conditions for preparation of Prog-3-CMO-BSA-gold NPs conjugate by passive adsorption of Prog-3-CMO-BSA immunogen on the colloidal gold surface were determined. It was find that linear range of immunoassay was between 0,0625 and 1 ng mL^{-1} and detection limit was 1 ng mL^{-1}.*

Key words: *immunoassay, colloidal gold nanoparticles, progesterone, progesterone-3-(O-carboxymethyloxime)-bovine serum albumin conjugate*

ВЪВЕДЕНИЕ

Прогестеронът е клинически важен кортикостероиден хормон, който се измерва рутинно в серум и плазма за за диагностициране и управление на вродена грешка в метаболизма, известна като вродена надбъбречна хиперплазия. Това нарушение е фатално, ако не се диагностицира рано и не се лекува съответно.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Реагенти

За изготвянето на конюгата Prog-3-CMO-BSA-gold NPs и създаването на имуноанализ за определяне концентрацията на прогестерон се използват следните реагенти: прогестерон-3-О-карбоксиметилоксим (Prog-3-CMO) от Sigma-Aldrich, говежди серумен албумин (BSA) от Sigma-Aldrich, 1-етил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодиимид-хидрохлорид (EDAC-HCL) от Fluka-Sigma-Aldrich, Tween-20 от Sigma-Aldrich, колоидно злато (размер на частиците 40 nm) от Diagnostic consulting network и Прогестерон (Prog) от Sigma-Aldrich.

Получаване на прогестерон-3-О-карбоксиметилоксим-BSA конюгат (Prog-3-CMO-BSA конюгат)

2.9 mg (7,75μmol) Prog-3-CMO се разтварят в 800 μL на диметилформамид. 4mg (20,9 μmol) N-етил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид хидрохлорид се разтварят в 300 μL на фосфатен буфер pH 5.6 и сместа се прибавя към разтвора на хормона. Реакционната смес се разбърква за 60 min на стайна температура.12,6 mg (0,19μmol) говежди серумен албумин (BSA) се разваря в 1 mL дейонизирана вода. Активираният прогестерон се прибавя бавно към ратвора на BSA. Реакционната смес се разбърква и инкубири цяла нощ при 4ºC. Полученият Prog-3-CMO-BSA конюгат се пречиства на хроматографска колона Sephadex G-25 (1,5 x 33) с използването на 0.01 M NaCl като мобилна фаза. Събират се фракции от 1 mL. Измерва се абсорбцията на всяка фракция на спектрофотометър (Boeco-Germany, Модел S-26) при дължина на вълната 249 nm (Prog-3-CMO-BSA конюгат), 254 nm (Prog-3-CMO) и 280 nm (BSA). Събират се фракциите, които имат най-високи абсорбции при 249 nm. Полученият конюгат (събраните фракции) се лиофилизира и се съхранява при - 18ºC.

Определяне на оптималните условия за маркиране на Prog-3-CMO-BSA със златни наночастици

За да се определи оптималното pH за конюгиране на Prog-3-CMO-BSA с колоидни златни частици е варирано pH на колоидната златна суспензия от 5.5 до 10.0. Смесват се 100 μL колоиден златен разтвор с различно pH с 5 μL разтвор на Prog-3-CMO-BSA (1.3 mg mL^{-1}) в ямките на микротитърна плоча. Смесите се разбъркват за 15-20 s и се инкубират за 20 min на стайна температура. Към всяка

ямка се прибавят 100 µL NaCl (1.0 M) и се измерва абсорбцията при 520 nm на RT-2100C Microplate Reader.

За да се определи оптималното количество на конюгата нужно да покрие повърхността на златните частици се варира неговото количество от 0 до 7 µL (1.3 mg mL^{-1}) в различни ямки. Към всяка ямка се прибавят 100 µL колоидно злато с оптимално pH (7.4). Разтворите се оставят да реагират за 20 min на стайна температура. Към всяка ямка се прибавят 100 µL 10% NaCl и се измерва абсорбцията при 520 nm на Microplate Reader, Модел RT-2100C.

Маркиране на Prog-3-CMO-BSA със златните наночастици при оптимални условия

Определеното оптимално количество Prog-3-CMO-BSA се прибавя към колоидния златен разтвор при постоянно разбъркване, при оптимално pH за 20 min на стайна температура. Прибавят се 30 µL 10% (w/v) BSA за блокиране на неспецифичните сайтове и сместта се разбърква за 20 min на стайна температура. След това се прибавят 10 µL на Tween-20 (1%) за допълнителна стабилизация на Prog-3-CMO-BSA конюгата. Разтворът се разбърква за 15 min на стайна температура и се центрофугира при 10 000g за 20 min. Prog-3-CMO-BSA-gold NPs се ресуспендира в промиващ буфер, оставя се да се уравновеси за 30-40 min и се центрофугира отново при 10 000g за 20 min, за да се отстрани несвързания конюгат от разтвора. Конюгатът се разтваря в 200 µL фосфатен буфер и се съхранява при 4ºC.

Имуноанализ със златни наночастици

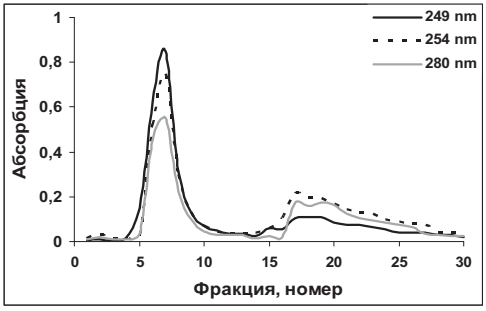
Разтворът на антитялото със специфична концентрация (50 µL за една ямка) се адсорбира в ямките на микротитърна плоча при 4ºC, 17 часа. След това ямките се измиват три пъти с миещ разтвор (300 µL за ямка) и се прибавят в тях 25 µL Prog-3-CMO-BSA-gold NPs и 25 µL стандартни разтвори на прогестерон (0, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.500, 1.00 ng mL^{-1}). Инкубират се при 4 ºC за 1h. Измерва се абсорбцията при дължина на вълната 520 nm на Microplate Reader, Модел RT-2100C. Процентът на свързване на прогестерона с антитялото се изчислява чрез уравнението:

$$B\% = A\ (\text{стандарт}) - A\ (\text{празна})/A\ (\text{нулева проба}) \times 100$$

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получаване на Prog-3-CMO-BSA конюгат

Конюгатът Prog-3-CMO-BSA се получава чрез химично свързване на прогестерон-3-О-карбоксиметилоксим с албумин (BSA) по карбодиимидния метод. За да се отдели и пречисти получения конюгат, сместта се пропуска през колона Sephadex G-25 и след това се измерва абсорбцията на разделените фракции (фиг.1).

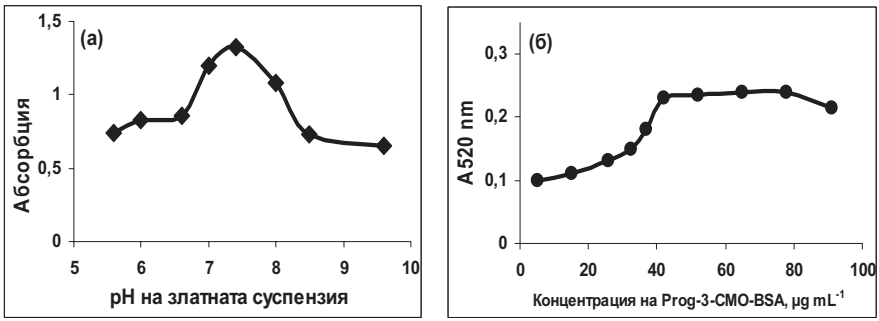


Фигура 1. Абсорбционен интензитет на отделените фракции на Sephadex G-25 колона при различна дължина на вълната

От фиг.1 се вижда, че най-висок е абсорбционния пик при 249 nm, който отговаря на образувания конюгат. За целта се събират фракции от номер 6 до 9, които съдържат конюгата.

Определяне на оптималните условия за маркиране на Prog- CMO-BSA със златни наночастици

Първо е определено оптималното pH за образуване на стабилен конюгат между Prog-3-CMO-BSA със златни наночастици на базата на тяхното електростатично взаимодействие. От фиг. 2а се вижда, че стабилен комплекс, с червен цвят се получава при pH стойност 7.4. Извън тази pH област комплексите са нестабилни и се променя цвета от червен в лилав, поради агрегиране на наночастиците. Следователно за оптимално pH за получаване на този конюгат подбираме pH 7.4.

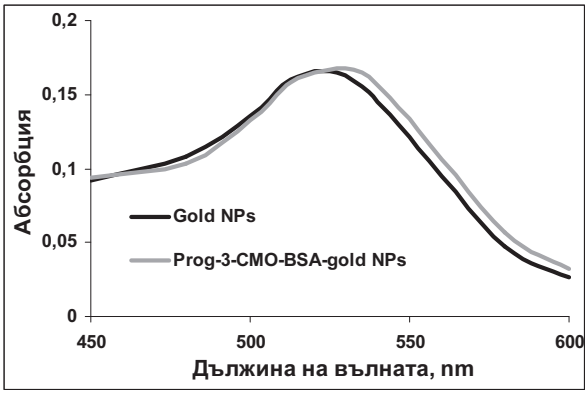


Фигура 2. Вляние на pH (а) и концентрацията на Prog-3-CMO-BSA (б) върху стабилността на конюгата Prog-3-CMO-BSA-gold NPs

Определена е и оптималната концентрация на Prog-3-CMO-BSA за конюгиране със златните наночастици. За целта е варирана концентрацията на Prog-3-CMO-BSA, а се поддържа оптимално pH 7.4. От измерените абсорбционните стойности, показани на фиг. 2б се вижда, че те са най-високи при концентрация на Prog-3-CMO-BSA от 42 μg mL^{-1} до 80 μg mL^{-1}. В този концентрационен интервал златните наночастици с адсорбирания Prog-3-CMO-BSA са стабилни, с червен цвят, а извън този интервал частиците агрегират и се оцветяват лилаво. Следователно оптималната концентрация на Prog-3-CMO-BSA е в определения концентрационен интервал, но окончателната концентрация ще бъде определена при провеждането на самия имуноанализ.

Доказване на получения при оптимални условия маркиран Prog-3-CMO-BSA със златни наночастици

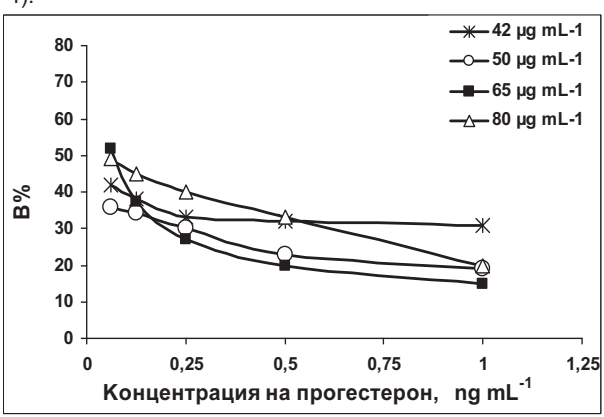
Полученият конюгат Prog-3-CMO-BSA-gold NPs е доказан чрез измерване на абсорбцията при 520 nm. Направено е сравнение с абсорбцията на златните частици при същата дължина на вълната. От фиг. 3 се вижда, че при конюгата е налице леко изместване на абсорбционния максимум спрямо този на златните наночастици и това е сигурно доказателство, че е получен конюгата. Подобни резултати са получени и от други автори [5, 6].



Фигура.3. Абсорбционен интензитет на конюгата Prog-3-CMO-BSA-gold NPs и златните наночастици (gold NPs) при дължина на вълната 520 nm

Имуноанализ със златни наночастици

С така приготвените конюгати е проведен имуноанализ със спектрофотометрична детекция за определяне концентрацията на прогестерон. Концентрацията на прогестерона е варирана от 0,0625 до 1.0 ng mL^{-1}. За да определим коя концентрация на конюгата Prog-3-CMO-BSA е най-подходяща в интервала определен в т. 2 (от 42 μg mL^{-1} до 80 μg mL^{-1}) са построени стандартни криви спрямо прогестерон за няколко подбрани концентрации на конюгата в този интервал (фиг. 4).



Фигура 4. Стандартни криви за определяне концентрацията на прогестерон в зависимост от концентрацията на Prog-3-CMO-BSA конюгат

От фиг. 4 и табл. 1 се вижда, че най-чувствителен е анализът при използването на конюгат с концентрация 65 μg mL^{-1} (чувствителност 126,29 B% ng^{-1} mL), но тази чувствителност е в границите от 0,0625 до 0,25 ng mL^{-1} прогестерон. Най-слабо чувствителен е анализът при концентрация на конюгата 42 μg mL^{-1}. Много добра е и стандартната права за прогестерон при 80 μg mL^{-1} конюгат, тъй като тя притежава най-голям линеен интервал от 0,0625 до 1.0 ng mL^{-1} прогестерон и чувствителността е сравнително добра 29,72 B% ng^{-1} mL. Следователно, за окончателна оптимална концентрация на конюгата Prog-3-CMO-BSA се подбира 80

μg mL^{-1}, с която се получава стабилен конюгат Prog-3-CMO-BSA-gold NPs и се осигурява добър имуноанализ за ниски концентрации на прогестерон.

Таблица 1.
Основни параметри на стандартните прави на прогестерон при използването на различни концентрации на Prog-3-CMO-BSA конюгат

Концентрация на Prog-3-CMO-BSA, μg mL^{-1}	Уравнение на линейната област	Корелационен коефициент, R^2	Линеен интервал, ng mL^{-1}
42	y = - 146.857x+44.5	R^2 = 0.9842	0.0625 – 0.25
50	y = - 29.83x+37.791	R^2 = 0.9985	0.0625 – 0.50
80	y = - 29.72x+48.917	R^2 = 0.9851	0.0625 – 1.00
65	y = - 126.29x+57.25	R^2 = 0.9224	0.0625 – 0.25
65	y = - 15.143x+29.50	R^2 = 0.9204	0.250 – 1.00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Създаден е имуноанализ с колоидни златни наночастици за определяне на ниски концентрации на прогестерон в интервала 0,0625 – 1,00 ng mL^{-1} и висока чувствителност 29,72 B% ng^{-1} mL.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Laitinen, M. P. A.; Vuento, M.; Affinity immunosensor for milk progesterone:identification of critical parameters. Biosens. Bioelecron. 11, 1996, 1207-1214.

[2] Laitinen, M. P. A.; Vuento, M.; Immunochromatographic Assay for Quantitation of Milk Progesterone. Acta Chem. Scand. 50, 1996, 141-145.

[3] Mattox, V. R., Litwiller R. D., Nelson A. N.; A comparison of procedures for attaching steroidal glucosiduronic acid to bovine serum albumin. J steroid Biochemistry 10, 1978, 167-172

[4] Moon, J.; Kim, G.; Lee, S.; A Gold Nanoparticle and Aflatoxin B1-BSA Conjugates Based Lateral Flow Assay Method for theAnalysis of Aflatoxin B1. Materials 5, 2012, 634-643.

[5] Nara, S.; Tripathi, V.; Singh, H.; Shrivastav, G. T.; Colloidal gold probe based rapid immunochromatographic strip assay for cortizol. Analytica Chimica Acta 682, 2010, 66-71.

[6] Tripathi, V.; Nara, S.; Singh, K.; Singh, H.; Shrivastav, G. T.; A competitive immunochromatographic strip assay for 17-ά-hydroxyprogesterone using colloidal gold nanoparticles. Clin. Chim. Acta 413, 2012, 262-268.

За контакти:

Цветомира Тошкова Иванова, редовен докторант, У-т „Проф. д-р Асен Златаров”, Бургас, тел.: 056/704508, e-mail: cvetomira1984@abv.bg

Доц. д-р Недялка Димова, У-т „Проф. д-р Асен Златаров”, Бургас, тел.: 056/702418, e-mail: nelidbg@abv.bg

Проф. дтн Цонка Иванова Годжевъргова ,У-т „Проф.д-р Асен Златаров”, Бургас, тел.: 056/716528, e-mail: godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран