

АДСОРБЦИЯ БЕЛКОВ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫЕ МЕМБРАНЫ ИЗ ПОТОКА РАСТВОРА – ТЕОРИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТ

© 2024 г. К.А. Прусаков*, С.В. Замалутдинова**, А.Е. Сидорова**, Д.В. Багров**.*

*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Малая Пироговская ул., 1а, Москва, 119435, Россия

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119991, Россия

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

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 05.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Некоторые лабораторные аналитические процедуры основаны на том, что исследуемую пробу пропускают через пористую полимерную мембрану. При этом аналит связывается с поверхностью мембраны, модифицированной специфическим рецепторным слоем, а затем обнаруживается с помощью оптического или электрохимического сигнала. В работе проведен экспериментальный и теоретический анализ закономерностей связывания аналита с нитроцеллюлозной мембраной. Рассмотрены два случая – специфическое связывание аналита с антителами, иммобилизованными на мембране, а также неспецифическая адсорбция аналита. Показано, что при увеличении объема пробы, прошедшего через мембрану, количество адсорбированного аналита растёт, и в общем случае это может использоваться для повышения чувствительности биосенсоров.

Ключевые слова: адсорбция, нитроцеллюлоза, мембрана, антитела.

DOI: 10.31857/S0006302924050029, EDN: MLOHZZK

Пористые полимерные мембраны являются незаменимым расходным материалом в лабораторных исследованиях. Их используют для различных видов блоттинга, например, вестерн-блоттинга, дот-блоттинга и других, кроме того, они являются компонентами тест-полосок и устройств «бумажной микрофлюидики» [1, 2]. Они могут быть изготовлены из нейлона-6, нитрата или ацетата целлюлозы, поливинилиденфторида или других полимеров.

В процедурах блоттинга растворы наносят на мембраны, а осаждение исследуемых веществ происходит под действием электрического поля или потока жидкости, созданного внешним источником давления. Объемы проб обычно небольшие и составляют порядка ~1–100 мкл. В то же время пористая структура мембраны допускает пропускание через нее сравнительно большого объема растворов. Например, антибактериальные фильтры с диаметром приблизительно 20–25 мм могут быть использованы для обработки

объема порядка ~100 мл и более. В связи с этим возникает вопрос: что будет происходить, если пропускать через мембрану большой объем пробы, содержащий аналит, размер которого значительно меньше размера поры, например, молекулу белка? Для такого аналита ситовой фильтрации не будет, но возможно, удастся собрать его из большого объема пробы – и за счет этого увеличить чувствительность анализа, выполняемого на мембране?

Задачи анализа проб, имеющих относительно большой объем (порядка нескольких миллилитров) и содержащих малое количество аналита, возникают при экологическом мониторинге состава водоемов и сточных вод, контроле качества продуктов питания, а также в некоторых медицинских анализах биологических жидкостей человека. Использование микропористых мембран считается эффективной стратегией в том случае, если анализ основан на образовании молекулярных комплексов на твердой поверхности, так как мембраны обеспечивают большую удельную площадь поверхности сенсорного слоя, чем плоские подложки [3–5].

Для эффективной доставки молекул аналита в толщу мембраны необходимо создать поток

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин, БСА-СуЗ – бычий сывороточный альбумин, меченый флуорофором СуЗ, PBS – фосфатно-солевой буфер, ИФА – иммуноферментный анализ, БКМТ – биотинилированный конъюгат мелатонина.

жидкости с помощью внешнего источника давления. Нами была предложена система, которая позволяет пропускать через мембрану сравнительно большой объем пробы (в данной работе использовали максимум 8 мл, что почти на два порядка больше, чем типичный объем 100 мкл, используемый в иммуно-ферментном анализе), а также контролировать скорость потока жидкости через нее. Ранее с помощью этой проточной системы было показано, что адсорбция анализата на поверхность полимера из потока жидкости происходит более интенсивно, чем при инкубации мембраны в растворе анализата [6].

В анализах, основанных на регистрации сигнала от мембраны, предел детекции (минимальная детектируемая концентрация) зависит от минимального количества анализата, осажденного на мембрану, которое необходимо для возникновения заметного сигнала. Если количество осажденного анализата можно увеличить, то это поможет сделать процедуру анализа более чувствительной, а в некоторых случаях — снизить время анализа [7]. Цель данной работы состояла в том, чтобы определить зависимость количества анализата, осажденного на мембрану, от объема пробы. Это было сделано для двух механизмов адсорбции: неспецифической физической адсорбции и специфической, для исследования которой на мембрану наносили антитела против анализата. В обоих случаях наблюдалось увеличение количества адсорбированного анализата от объема пробы, причем экспериментальные результаты находились в хорошем соответствии с теоретическими оценками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общая схема эксперимента и проточная ячейка для обработки мембран. Для исследования адсорбции анализатов на поверхности мембран при протекании сквозь них растворов была использована оригинальная система зажимов. В них мембрана зафиксирована так, что поток жидкости поступает перпендикулярно ее лицевой стороне. Структура зажима ограничивает область мембраны диаметром 6 мм и имеет специальные поддерживающие элементы, которые не позволяют мембране прогибаться под действием потока жидкости.

Зажим изготовлен из листа поликарбоната толщиной 6 мм с помощью фрезеровки и сверления. Для подключения шлангов с растворами в отверстиях на зажиме с помощью эпоксидного клея закреплены металлические трубки с внешним диаметром 0.8 мм. Поддерживающие элементы и элементы, ограничивающие рабочую область мембраны, изготовлены из листов полиэтилентерефталата толщиной 0.2 мм с помощью лазерной абляции на станке GLS Spirit (GCC, Китай). Эти элементы приклеены к поверхности по-

ликаarbonата с помощью листового акрилового адгезива 3М 468MP. «Мертвый» объем такой системы составил приблизительно 100 мкл. На рис. 1а представлена схема зажима, стрелками указано направление потока жидкости. Для фиксации зажима используется внешняя оправка из металлических деталей, скрепляемых винтами. Был изготовлен зажим для одновременной обработки шести мембран (рис. 1б). Для создания потока жидкости через них использовали перистальтический насос BT100M DG-8 (Chongy, Китай) и силиконовые шланги TYGON S3 с внутренним диаметром 0.51 мм.

Перед экспериментами внутренние поверхности зажима и шлангов блокировали путем пропускания 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), затем промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и только после этого мембрану размещали в зажиме. После каждого эксперимента систему промывали 70% этанолом, дистиллированной водой и высушивали потоком воздуха.

Как показано на рис. 1б, информация об адсорбции анализата на мембрану может быть получена путем измерения оптического сигнала от мембраны либо путем измерения концентрации анализата в растворе, прошедшем через мембрану. Во всех экспериментах использовали мембраны из нитроцеллюлозы с эффективным диаметром пор 0.45 мкм (1620115, Bio-rad, США).

Измерение неспецифической адсорбции. Для анализа неспецифической адсорбции использовали бычий сывороточный альбумин, меченный флуорофором Cy3 (БСА- Cy3) (рис. 2а). Перед сборкой ячейки мембраны из нитроцеллюлозы обработали в тлеющем разряде на приборе Emittech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) с двух сторон. Обработку проводили при силе тока 30 мА в течение 45 с.

В эксперименте использовали растворы с одинаковой концентраций БСА- Cy3 и разными объемами. Концентрация раствора, подаваемого на каждый кусочек мембраны, составляла 500 нг/мл, а объемы были равны 1, 2, 4, 6 и 7 мл. Их пропускали через мембрану однократно, со скоростью 125 мкл/мин.

Флуоресценцию мембран измеряли на планшетном ридере Chameleon (Hidex, Финляндия) с фильтром возбуждения 540/10 нм и фильтром эмиссии 580/10 нм. Для этого мембраны извлекали из зажима, ножом для панч-биопсии вырезали из них фрагменты с диаметром 6 мм и располагали эти фрагменты в 96-луночном планшете.

С помощью этого же прибора определяли концентрацию БСА- Cy3 в растворах, которые прошли через мембраны. Для этого использовали калибровочную зависимость интенсивности

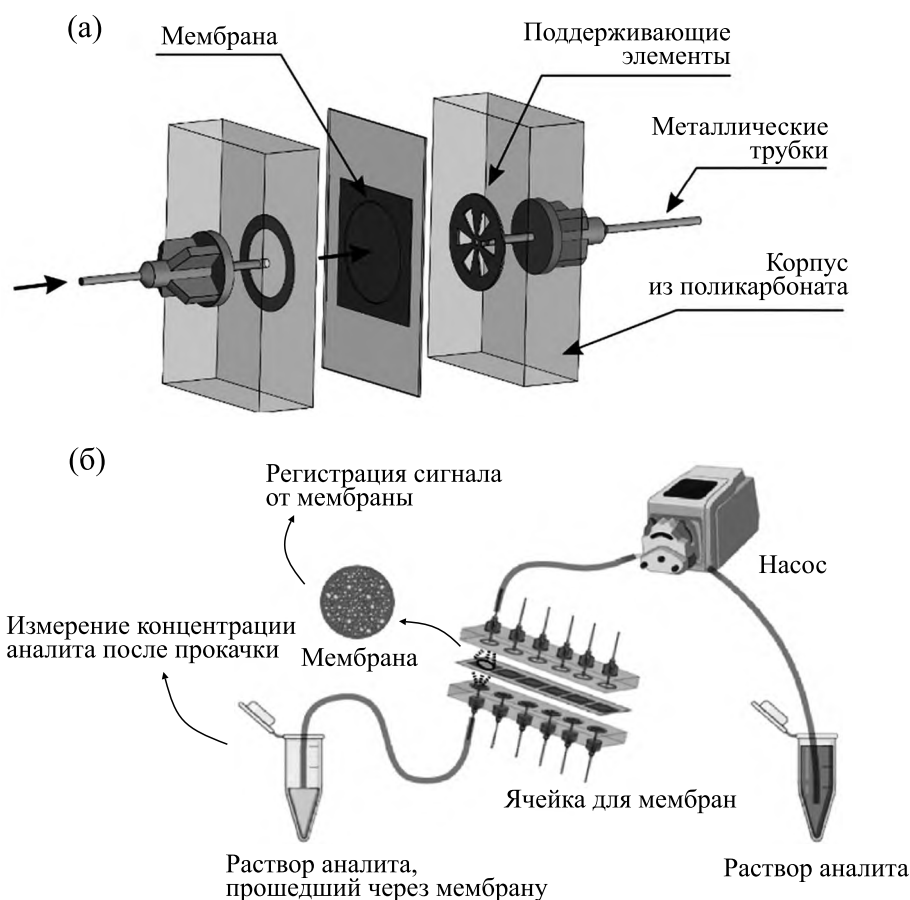


Рис. 1. Схема проточной системы (а) и общая схема эксперимента (б).

флуоресценции от концентрации раствора, использовали точки калибровки 500, 400, 300, 200, 100 и 0 нг/мл.

Измерение специфического связывания и иммуноанализ. В экспериментах по специфическому связыванию аналита с мембраной использовали компоненты набора реагентов KSA908Ge11 для определения мелатонина методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Cloude-Clone Corp., США). В качестве аналита выступал биотинилированный конъюгат мелатонина (БКМТ) с БСА. Для обеспечения аффинного связывания на мембраны наносили улавливающие антитела против мелатонина, это делали путем циклического пропускания раствора с концентрацией 8.3 мкг/мл (разведение стокового раствора 1 : 100) через мембраны в течение 1 ч. После этого мембраны блокировали с помощью реагента, предлагаемого производителем, в течение 1 ч.

Через подготовленные мембраны пропускали растворы БКМТ разного объема и одинаковой концентрации (50 нг/мл) один раз со скоростью 125 мкл/мин. Объемы проб составляли 1, 2, 4, 6 и

8 мл. Для измерения снижения концентрации аналита все пробы собирали на выходе из системы.

Уменьшение концентрации БКМТ в растворах, прошедших сквозь реакционную камеру, оценивали методом ИФА в ячейках 96-луночного планшета (использовали предельно упрощенный вариант ИФА, так как аналит биотинилирован и его сравнительно легко обнаружить). Для калибровки использовали последовательные разведения стокового раствора БКМТ в PBS (pH 7.4) в два раза до минимальной концентрации 0.8 нг/мл.

Анализ проводили по протоколу, предлагаемому производителем, с небольшими изменениями. Улавливающие антитела разводили в проприетарном буфере (pH 9.5) до концентрации 0.83 мкг/мл и наносили по 100 мкл в лунку, инкубировали 1 час (здесь и далее при 37°C и покачивании со скоростью 130 об/мин). Промывали один раз буфером PBS с добавлением 0.075% Tween-20 в течение 1 мин, затем инкубировали с 200 мкл блокирующего буфера в течение часа для

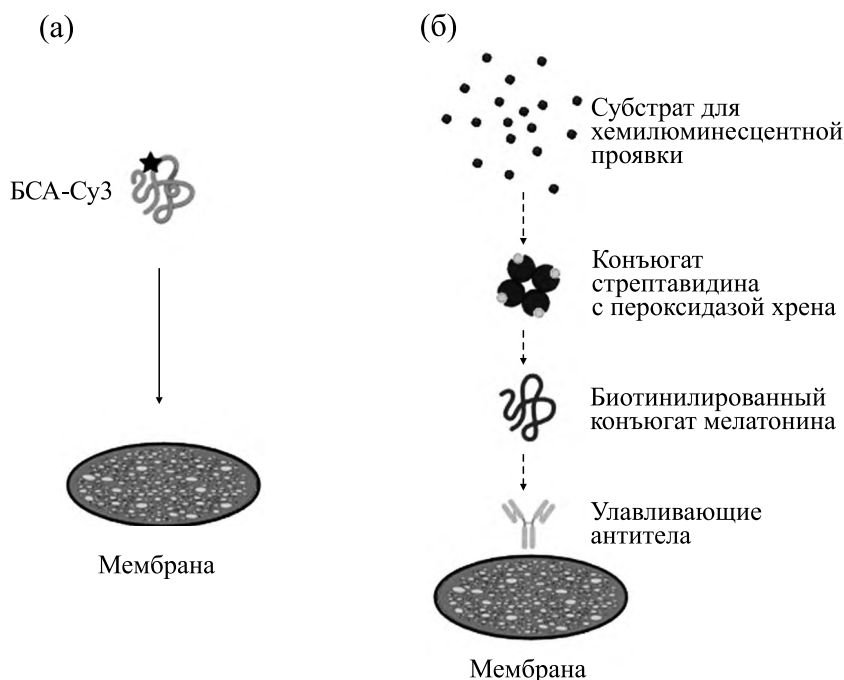


Рис. 2. Схема связывания аналита с подложкой: (а) — неспецифическое связывание, (б) — специфическое связывание.

блокирования неспецифических сайтов связывания и однократно промывали.

Образцы и калибровочные растворы объемом 50 мкл вносили в лунки в двух повторностях, инкубировали 1 ч, после чего трижды отмывали. Затем наносили 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, инкубировали 30 мин и пять раз промывали. На последнем этапе вносили по 90 мкл тетраметилбензидаина, инкубировали 15 мин и добавляли 50 мкл 0.5 М серной кислоты. Измерение оптической плотности при 450 нм проводили на полуавтоматическом планшетном фотометре STAT FAX 2100 (Awareness Technology Inc., США).

Для измерения сигнала от мембран (рис. 2б) с ними провели аналогичную процедуру. После прокачки растворов аналита мембраны отмывали путем пропускания PBST. Затем с помощью реакционной камеры через каждую мембрану циклически пропускали по 500 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена в течение 30 минут. Мембраны отмывали путем последовательного пропускания 3 мл PBS с добавлением 0.075% Tween-20 и 3 мл PBS, затем их извлекали из камер, располагали на предметном стекле и добавляли хемилюминесцентный субстрат Affinity ECL (ООО «БелкиАнтитела», РФ). Интенсивность хемилюминесценции измеряли на приборе ChemiDoc (BioRad, США).

Математическая модель адсорбции аналита на мембрану из потока жидкости. Для теоретического описания процессов, происходящих в объеме мембраны, нами ранее была разработана математическая модель на основе системы дифференциальных уравнений диффузии, массопереноса потоком жидкости и кинетики адсорбции [8]. В основе модели лежат два уравнения:

$$\frac{\partial C(z,t)}{\partial t} + \frac{\partial S(z,t)}{\partial t} = D_{\text{eff}} \frac{\partial^2 C(z,t)}{\partial z^2} - U_{\text{flow}} \frac{\partial C(z,t)}{\partial z},$$

$$\frac{\partial S(z,t)}{\partial t} = k_{\text{on}} C(z,t) (\Gamma_v - S(z,t)) - k_{\text{off}} S(z,t),$$

где z — координата по оси, направленной перпендикулярно плоскости мембраны в направлении потока; $C(z,t)$ — концентрация аналита в растворе как функция от координаты и времени; $S(z,t)$ — концентрация аналита, адсорбированного на мембране, как функция от координаты и времени; D_{eff} — эффективный коэффициент диффузии аналита в порах мембраны; U_{flow} — линейная скорость потока жидкости; k_{on} и k_{off} — кинетические константы прямой и обратной реакции комплексообразования на поверхности мембраны; Γ_v — объемная концентрация сайтов связывания на мембране. На практике с помощью перистальтического насоса задается объемная скорость

прокачки. Линейная же скорость потока жидкости сквозь мембрану U_{flow} вычисляется с учетом площади мембраны (в данной работе это круг с диаметром 6 мм).

Данную систему дифференциальных уравнений решали численно и вычисляли пространственное распределение концентрации адсорбированного анализита как функцию от времени. Поскольку объемная скорость прокачки постоянна, зависимость от времени может быть легко преобразована в зависимость от прокаченного объема пробы.

Для сравнения результатов моделирования с экспериментальными данными дополнительно проводили численное интегрирование полученных функций распределения по объему мембраны. Это позволяло рассчитать общее количество анализита, связанного с мембраной. В отличие от пространственного распределения, интегральная величина может быть легко измерена экспериментально по падению концентрации анализита в растворах, протекающих сквозь реакционную камеру.

Кроме общего количества анализита, связанного с мембраной, по пространственным распределениям количества связанного анализита вычисляли его количество на лицевой стороне мембраны при $z = 0$. Это количество связано с оптическими сигналами, зарегистрированными от мембран, — флуоресцентным (в случае физической адсорбции) или хемилюминесцентным (в случае специфического связывания).

В обоих случаях сигналы детектировали с лицевой стороны мембраны, т.е. с той стороны, с которой поступал поток раствора анализита. Эти измерения позволяют оценить количество анализита в тонком приповерхностном слое, из которого может быть собран оптический сигнал. Оцененная таким способом концентрация связанного анализита в приповерхностном слое также была сопоставлена с результатами численного моделирования. Для этого использовали сечения полученных расчетных пространственных распределений концентрации связанного анализита по $z = 0$, т.е. по лицевой поверхности мембраны. Измерения оптических сигналов от мембран не позволяют определить количество адсорбированного анализита без калибровки и могут быть сопоставлены с результатами расчетов только визуально. Тем не менее, эти данные можно рассматривать как дополнительный метод, подтверждающий предложенную концепцию и корректность математической модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая схема экспериментов и теоретические предпосылки. Для измерения зависимости коли-

чества связанного с мембраной анализита от объема пробы нами была создана система зажимов, которая позволяет зафиксировать мембрану в потоке раствора (рис. 1). В данной системе для создания потока жидкости использовали перистальтический насос. Он имеет преимущество перед альтернативными способами (шприцевой или вакуумный насос), так как позволяет пропускать через мембрану сравнительно большие объемы растворов (порядка ~1 мл), а при необходимости — циклически пропускать через мембрану пробу небольшого объема. Кроме того, имеется возможность менять направление прокачки, а также одновременно обрабатывать несколько мембран с одинаковой скоростью потока жидкости.

Измеряемой величиной во всех экспериментах являлось количество анализита, адсорбированного на мембране, которое вычисляли по снижению концентрации в растворах, прошедших сквозь мембраны. Были рассмотрены два механизма адсорбции анализита на мембрану: неспецифическая физическая адсорбция и специфическое взаимодействие между антигеном и антителом. В первом случае анализитом являлся флуоресцентно меченый БСА. Снижение его концентрации в растворе определяли путем измерения интенсивности флуоресценции растворов и сравнения полученных значений с калибровочной кривой. Во втором случае взаимодействие исследовали на примере антител против мелатонина и БКМТ. Снижение концентрации БКМТ измеряли с помощью ИФА с колориметрической детекцией.

Для теоретического исследования свойств проточной аналитической системы была разработана математическая модель, описывающая процессы диффузии и адсорбции системой дифференциальных уравнений [8]. Данная модель имеет несколько допущений. Во-первых, поскольку латеральные размеры мембраны в эксперименте (диаметр 6 мм) намного превосходят ее толщину (~110–115 мкм), в математическом моделировании рассматривали одномерную задачу. Модель пренебрегала потоками и диффузией в направлениях, перпендикулярных нормали к внешней поверхности мембраны. Таким образом, модель описывала только процессы, происходящие в центральной области, ограниченной диаметром держателя (6 мм), и игнорировала краевые эффекты вблизи границ. Во-вторых, сложная пространственная структура мембраны и распределение по ней сайтов связывания были заменены на равномерное распределение сайтов связывания с постоянной объемной концентрацией Γ_v . В-третьих, для того чтобы учесть влияние структуры мембраны на диффузию молекул анализита внутри пор, был введен эффективный коэффициент диффузии D_{eff} , который меньше

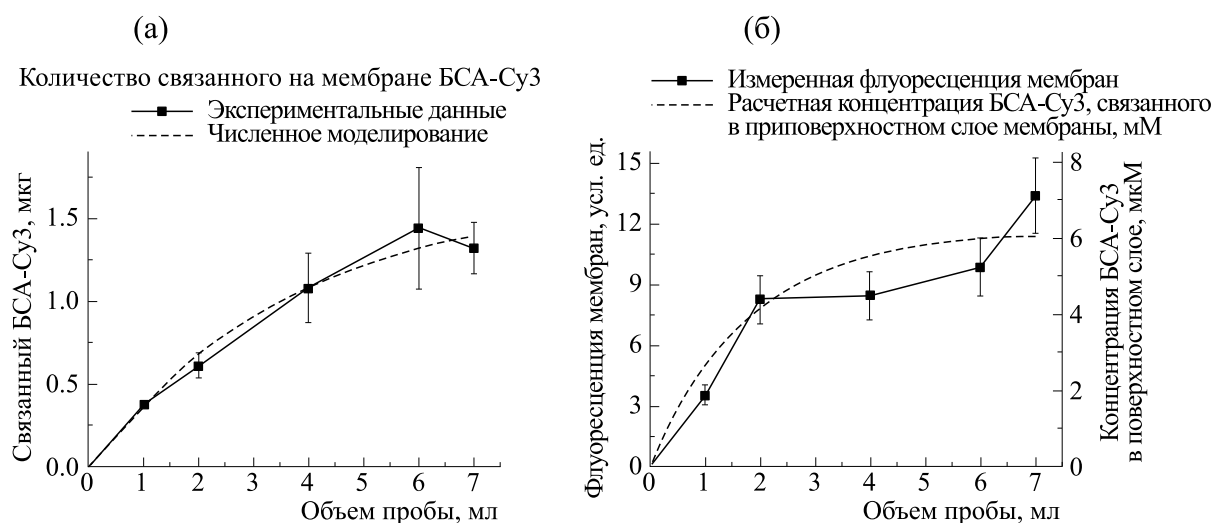


Рис. 3. Результаты измерения неспецифического связывания в зависимости от прокаченного объема пробы: (а) — измеренное количество адсорбированного БСА-Су3, связанного с мембраной, и результаты расчета; (б) — флуоресцентный сигнал от мембраны и результат расчета концентрации аналита в приповерхностном слое мембраны с лицевой стороны.

коэффициента диффузии молекул аналита в свободном объеме:

$$D_{\text{eff}} = \varepsilon D/2,$$

где ε — величина пористости мембраны, которую в литературе обычно оценивают как 0.4–0.6. Граничные условия для системы дифференциальных уравнений определяли из условий проведения эксперимента. Так, поскольку в мембрану всегда поступает поток раствора с одной и той же концентрацией аналита C_0 , граничное условие на лицевой стороне принимает следующий вид:

$$C(0, t) = C_0.$$

На той поверхности мембраны, из которой вытекает поток раствора, граничное условие отражает требование отсутствия изменения объемной концентрации аналита, так как адсорбция происходит только внутри мембраны:

$$\left. \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} \right|_{z=h} = 0,$$

где h — толщина мембраны.

В данном исследовании в экспериментах варьировали только объем пробы, а все остальные параметры (концентрации аналитов, скорость прокачки, тип мембраны) оставались неизменными. Для обоих аналитов (БСА и БКМТ) скорость прокачки была равна 125 мкл/мин. Данные о кинетических константах реакций комплексообразования и концентрации сайтов связывания, требующиеся для проведения численных расчетов, выбирали на основе литературных данных [9–11], а затем варьировали, чтобы расчетные

кривые наиболее точно соответствовали экспериментальным данным.

Измерение неспецифической адсорбции. Как зависит количество аналита, захваченного мембраной, от объема раствора, прошедшего через нее? Результаты эксперимента, выполненного с БСА, представлены на рис. 3. Исходная концентрация раствора составляла 500 нг/мл, а после пропускания через мембрану она снижалась до 100–300 нг/мл в зависимости от прокаченного объема пробы. Объемы растворов составляли 1, 2, 4, 6 и 7 мл, соответственно масса БСА, осажденного на мембрану, лежала в диапазоне 0–1.5 мкг (рис. 3а). Мы считали, что весь БСА, ушедший из раствора, остался именно на мембране, так как все поверхности шлангов и соединений, с которыми контактировал раствор, были заблокированы, и мы пренебрегали адсорбцией БСА на них.

Зависимость массы БСА, адсорбированного на мембране, от прокаченного объема пробы, была использована для выбора констант численного моделирования, а именно кинетических констант k_{on} и k_{off} , а также объемной плотности сайтов связывания Γ_v . Хорошее соответствие между результатами экспериментов и результатами расчетов достигалось при значениях $k_{\text{on}} = 3.75 \cdot 10^3$ (моль·с) $^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1.15 \cdot 10^{-3}$ с $^{-1}$, $\Gamma_v = 0.35$ мМ. Соответствующая кривая показана на рис. 3а пунктиром, квадрат коэффициента корреляции Пирсона $R^2 = 0.986$. Таким образом, для неспецифической физической адсорбции конъюгата БСА на обработанную в тлеющем разряде нитроцеллюлозу константу диссоциации можно оценить $K_d = 0.3$ мкМ,

что соответствует литературным данным. Например, по данным ионообменной хроматографии константа диссоциации для адсорбции БСА на поверхность агарозного сорбента составляла 3.6 мкМ [12] или, по другим оценкам, — в диапазоне 0.46–22.3 мкМ [13].

Для дополнительной проверки на рис. 3б приведено сравнение интенсивности флуоресценции мембран с теоретически рассчитанной концентрацией анализита в приповерхностном слое мембраны. Видно, что эти графики разумно совпадают, хотя сравнивать их аналитически сравнительно сложно. Действительно, описанные измерения сигналов от мембран аналогичны тем, которые делают при дот-блоттинге, а он является качественным или полуколичественным, но не количественным методом. В данном случае зависимость интенсивности флуоресценции от количества адсорбированного флуоресцентно меченого белка не откалибрована, и ее сложно измерить, так как неизвестно, с какой именно глубины мембраны собирается оптический сигнал. Кроме того, расчеты показывают, что в нашей системе наблюдается сложное распределение концентрации связанного анализита по глубине мембраны, которое трудно поддается калибровке. Тем не менее, качественное совпадение зависимостей на рис. 3б является дополнительным подтверждением того, что адсорбция возрастает по мере увеличения объема пробы, а также применимости вычислительной модели.

Из полученных зависимостей видно, что математическая модель корректно описывает экспериментальные данные, позволяет прогнозировать количество адсорбированного анализита и динамику поведения системы. Кроме того, можно заметить, что все полученные зависимости выпуклы вверх и стремятся к выходу на плато. Так происходит из-за насыщения сорбционной емкости мембраны и стремления системы к равновесию. Однако на данных скоростях прокачки и объемах пробы равновесие и насыщение не были достигнуты. Разработанная модель позволяет оптимизировать эти параметры без дополнительных экспериментов и адаптировать систему под задачи конкретной аналитической платформы или биосенсора.

Эксперименты, описанные в данном разделе, а также наши более ранние эксперименты с аналогичной проточной системой [6] позволили выявить важную методическую особенность. Пузырьки воздуха, попавшие в систему с потоком растворов, могут закупорить реакционную камеру и исказить результаты анализа. Так происходит вследствие того, что реакционная камера пе-

регорожена гидрофильной микропористой мембраной, которая, будучи смоченной, не пропускает сквозь себя воздух при давлениях, которые может создать перистальтический насос. Наиболее остро эта проблема проявлялась при первом заполнении системы и решалась несколькими сменами направления потока через мембрану, пока все пузырьки воздуха не покидали систему. За счет малого «мертвого» объема системы, израсходованный на эти манипуляции объем раствора практически не влиял на результаты эксперимента.

Измерение специфического связывания. В исследовании специфического комплексообразования на мембране в качестве анализита был использован биотинилированный конъюгат мелатонина, а в качестве молекул рецепторного слоя использовали антитела против мелатонина. БКМТ представляет собой конъюгат трех компонентов — БСА, мелатонина и биотина. Он используется в коммерческом наборе для ИФА на мелатонин, основанном на конкурентном взаимодействии. В данной работе он выполнял роль удобного для обнаружения анализита — за счет биотинилирования, он может быть обнаружен с помощью конъюгатов стрептавидина с пероксидазой хрена и последующего добавления колориметрического или хемилюминесцентного субстрата. В состав набора реагентов для ИФА входит раствор БКМТ с известной концентрацией. В обычном ИФА он является служебным реагентом (конкурентом), а в наших экспериментах — анализитом.

В экспериментах по исследованию специфического связывания на мембрану наносили последовательно разные растворы: улавливающие антитела, блокирующий раствор, анализит, а также необходимый для регистрации сигнала от мембраны проявляющий раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Все растворы наносили на мембрану с помощью проточной аналитической системы.

После пропускания раствора БКМТ через мембрану было измерено снижение его концентрации и вычислено количество БКМТ, связанного с мембраной. Как и в эксперименте по измерению неспецифического связывания, мы предполагали, что уменьшение концентрации обусловлено адсорбцией анализита на мембрану, а не на шланги или их соединения с камерой. На рис. 4а представлен график зависимости количества связанного БКМТ от использованного объема анализита, он представляет собой возрастающую кривую. С помощью моделирования были выбраны следующие значения констант: $k_{\text{он}} = 2.75 \cdot 10^3 \text{ (моль} \cdot \text{с)}^{-1}$, $k_{\text{офф}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, $\Gamma_v = 0.24 \text{ мМ}$.

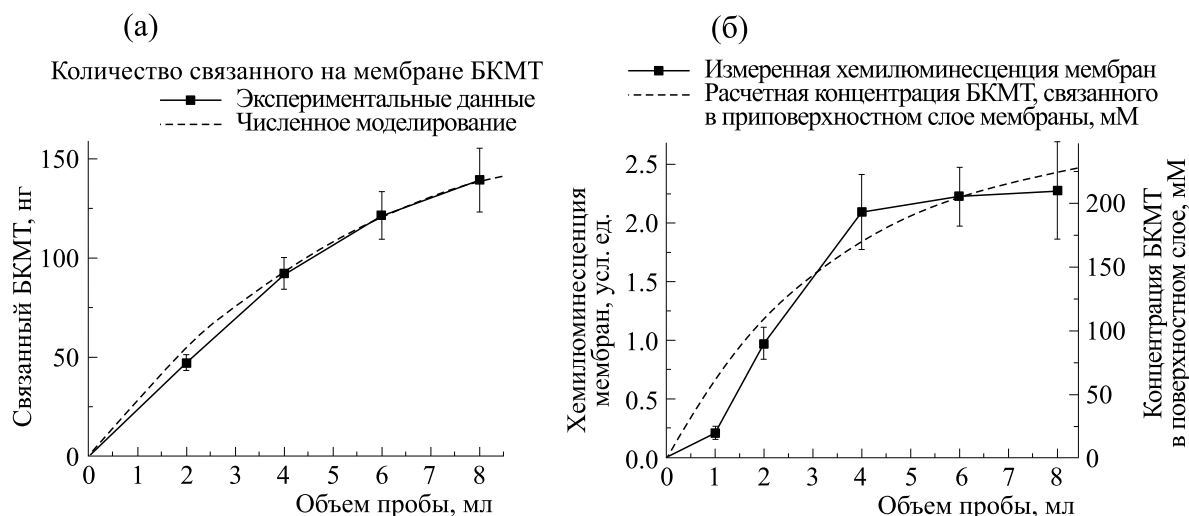


Рис. 4. Результаты измерения специфического связывания в зависимости от прокаченного объема: (а) — количество БКМТ, связанного с мембраной, вычисленное по убыли концентрации БКМТ в растворе; (б) — хемилуминесцентный сигнал от мембран и результат расчета концентрации БКМТ в приповерхностном слое мембраны с лицевой стороны.

Квадрат коэффициента корреляции Пирсона составил $R^2 = 0.997$. Соотношение скоростей прямой и обратной реакций позволяет вычислить константу диссоциации: $K_d = 0.18$ нМ — это хорошо соответствует характерным значениям константы диссоциации для взаимодействия между антигеном и антителом [14–16]. Количество сайтов связывания Γ_v оказалось меньше, чем в случае неспецифической адсорбции, так как специфическое связывание анализита возможно только на тех участках поверхности полимера, на которых адсорбированы антитела, причем их антиген-связывающий участок экспонирован в раствор.

При выбранных константах была вычислена концентрация БКМТ в приповерхностном слое мембраны, она показана пунктирной линией на рис. 4б. Она хорошо соответствует измеренным хемилуминесцентным сигналам. Расхождения могут быть связаны с тем, что находящиеся в зажиме мембраны деформируются и после извлечения оказываются не совсем плоскими. Это приводит к неоднородному растеканию хемилуминесцентного субстрата и, как следствие, влияет на регистрируемую интенсивность хемилуминесценции. При исследовании неспецифической адсорбции такой проблемы не возникало, потому что флуоресцирующий реагент (конъюгат БСА с Су3) был нанесен в проточной системе, а хемилуминесцентный субстрат наносили после извлечения мембран из нее.

Ранее нами было теоретически показано, что пропускание большого объема пробы через мембрану позволяет сконцентрировать на ней

аналит — вплоть до насыщения всех доступных сайтов связывания [8]. Это может быть полезно для снижения предела детекции аналитических методов, которые основаны на регистрации сигнала от мембраны, таких как дот-блоттинг. В данной работе это теоретическое предсказание было подтверждено экспериментально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение чувствительности лабораторных анализов является сложной инженерно-технической задачей. Для анализов, в которых предусмотрена адсорбция анализита из подвижной фазы на неподвижный твердый носитель, чувствительность может быть улучшена за счет большого объема пробы. В данной работе это было продемонстрировано для двух систем, в которых происходила адсорбция молекул белка на поверхность пористой мембраны.

Эксперименты были выполнены с помощью проточной системы, которая позволяет пропускать исследуемые растворы через мембрану с заданной скоростью. Были рассмотрены два случая: неспецифическая адсорбция и специфическая, для исследования которой на мембраны наносили антитела против анализита и затем блокировали свободные сайты связывания. В обоих случаях количество анализита, осажденного на мембрану из потока, возрастало по мере увеличения объема пробы. Это было подтверждено как измерениями снижения концентрации анализита в пробе, так и оптическими сигналами от анализита, осажденного на мембрану.

Экспериментальные результаты были использованы для моделирования процесса адсорбции с использованием теоретической модели, предложенной ранее [8]. Были получены константы диссоциации, равные 0.3 мкМ и 0.18 нМ для неспецифической адсорбции и специфического связывания соответственно.

В дальнейшем представляет интерес проведение аналогичных измерений в более широком диапазоне концентраций аналита и для разных скоростей подачи аналита на мембрану. Такие работы помогут развитию мембранных аналитических систем и биосенсоров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sule R., Rivera G., and Gomes A. V. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, **75** (3), 99–114 (2023). DOI: 10.2144/btn-2022-0034
2. Chen X. and Shen J. Review of membranes in microfluidics. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92** (2), 271–282 (2017). DOI: 10.1002/jctb.5105
3. Ishikawa E. Factors limiting the sensitivity of noncompetitive heterogeneous solid phase enzyme immunoassays. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. by P. C. van der Vliet and S. Pillai (Elsevier, 1999), V. 27, pp. 7–16. DOI: 10.1016/S0075-7535(08)70563-1
4. Mansfield M. A. Nitrocellulose membranes for lateral flow immunoassays: a technical treatise. In *Lateral Flow Immunoassay*. Ed. by R. Wong and H. Tse (Humana Press, 2009), pp. 1–19. DOI: 10.1007/978-1-59745-240-3_6
5. Pavlova E., Maslakova A., Prusakov K., and Bagrov D. Optical sensors based on electrospun membranes – principles, applications, and prospects for chemistry and biology. *New J. Chem.*, **46** (18), 8356–8380 (2022). DOI: 10.1039/D2NJ01821G
6. Maslakova A., Prusakov K., Sidorova A., Pavlova E., Ramonova A., and Bagrov D. Pressure-driven sample flow through an electrospun membrane increases the analyte adsorption. *Micro*, **3** (2), 566–577 (2023). DOI: 10.3390/micro3020038
7. Hosseini S., Azari P., Aeinehvand M. M., Rothan H. A., Djordjevic I., Martinez-Chapa S. O., and Madou M. J. Intrant ELISA: A novel approach to fabrication of electrospun fiber mat-assisted biosensor platforms and their integration within standard analytical well plates. *Appl. Sci.*, **6** (11), 336 (2016). DOI: 10.3390/app6110336
8. Prusakov K. A. and Bagrov D. V. Convection-diffusion-adsorption model for the description of the analyte-binding reactions on a membrane. *Anal. Lett.*, 1–17 (2024). DOI: 10.1080/00032719.2023.2301503
9. Frutiger A., Tanno A., Hwu S., Tiefenauer R. F., Vörös J., and Nakatsuka N. Nonspecific binding - fundamental concepts and consequences for biosensing applications. *Chem. Rev.*, **121** (13), 8095–8160 (2021). DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00044
10. Squires T. M., Messinger R. J., and Manalis S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature Biotechnol.*, **26** (4), 417–426 (2008). DOI: 10.1038/nbt1388
11. Stenberg M. and Nygren H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J. Immunol. Methods*, **113** (1), 3–15 (1988). DOI: 10.1016/0022-1759(88)90376-6
12. Yamamoto S. and Sano Y. Short-cut method for predicting the productivity of affinity chromatography. *J. Chromatography A*, **597** (1–2), 173–179 (1992). DOI: 10.1016/0021-9673(92)80107-6
13. Patel B. C. and Luo R. G. Protein adsorption dissociation constants in various types of biochromatography. *Studies in Surface Science and Catalysis*, **120 A**, 829–845 (1999). DOI: 10.1016/S0167-2991(99)80573-4
14. Landry J. P. P., Ke Y., Yu G.-L. L., and Zhu X. D. D. Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *J. Immunol. Methods*, **417**, 86–96 (2015). DOI: 10.1016/j.jim.2014.12.011
15. Pellequer J. L. L. and Van Regenmortel M. H. V. H. V. Measurement of kinetic binding constants of viral antibodies using a new biosensor technology. *J. Immunol. Methods*, **166** (1), 133–143 (1993). DOI: 10.1016/0022-1759(93)90337-7
16. Cho H. K., Seo S. M., Cho I. H., Paek S. H., Kim D. H., and Paek S. H. Minimum-step immuno-analysis based on continuous recycling of the capture antibody. *Analyt.*, **136** (7), 1374–1379 (2011). DOI: 10.1039/c0an00811g

Adsorption of Proteins onto Nitrocellulose Membranes from a Flowing Solution – Theory and Experiment

K.A. Prusakov*, S.V. Zamalutdinova, A.E. Sidorova**, and D.V. Bagrov****

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

***Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

Some analytical laboratory procedures involve passing the sample through a porous polymer membrane. In this process, the analyte binds to the surface of the membrane modified with a specific receptor layer and is then detected using optical or electrochemical signals. This paper presents an experimental and theoretical analysis of the binding patterns of the analyte to nitrocellulose membranes. Two cases are considered: specific binding of the analyte to antibodies immobilized on the membrane and non-specific adsorption of the analyte. It is shown that increasing the volume of the sample passed through the membrane leads to an increase in the amount of adsorbed analyte, and this can generally be used to improve the sensitivity of biosensors.

Keywords: adsorption, nitrocellulose, membrane, antibodies