

УДК 535.375.5

ЭКСПРЕСС-ДЕТЕКЦИЯ БОТУЛОТОКСИНА ТИПА А С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АПТАСЕНСОРА И ЭФФЕКТА SERS

© 2024 г. О. А. Амбарцумян^{1,*}, А. М. Бровка¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»
Москва, Россия

*E-mail: ambartsumian.oa@mipt.ru

Поступила в редакцию 25.09.2023

После доработки 16.10.2023

Принята к публикации 31.10.2023

Описана разработка биосенсора для быстрого и чувствительного детектирования ботулинического токсина типа А. Сенсор представляет собой SERS-подложку с оптимизированной концентрацией меченых аптамеров, иммобилизованных на ее поверхности. Он позволяет проводить детектирование ботулинического токсина типа А с пределом обнаружения 2.4 нг/мл за 1 ч.

DOI: 10.31857/S0367676524020097, EDN: RSHEGU

ВВЕДЕНИЕ

Ботулинический токсин (BoNT), продуцируемый *Clostridium botulinum*, является одним из самых опасных биологических агентов. Наряду с сибирской язвой, чумой, туляремией и вирусными геморрагическими лихорадками он отнесен к категории А Центром по контролю и профилактике заболеваний США [1–3]. LD₅₀ ботулотоксина при попадании в организм составляет: 10–13 нг/кг ингаляционно, 1.3–2.1 нг/кг внутривенно и 1 мг/кг перорально [4]. Эти данные получены для двух самых распространенных типов токсина А и В (BoNT А и BoNT В). По некоторым данным 1 г диспергированного BoNT в виде аэрозоля может убить до 1 млн людей в густонаселенной местности [5]. Ввиду того, что он относительно легко может быть получен кустарным способом, BoNT является привлекательным в качестве оружия массового поражения при осуществлении актов биотерроризма. Его применение в современной косметической медицине в составе известных медицинских препаратов облегчает задачу потенциальным террористам по маскировке и транспортировке больших количеств очищенного токсина.

Единственный одобренный на сегодняшний день FDA метод определения BoNT, так называемый «золотой стандарт», основан на определении токсичности препаратов по отношению к мышам [6,7]. Несмотря на высокую чувствительность этого метода (порядка 10–20 пкг/мл), он является весьма продолжительным (около 7 сут), что не соответствует современным требованиям,

предъявляемым к инструментам обеспечения национальной безопасности и здоровья людей. В связи с этим ведутся разработки различных вариантов экспресс-детекции BoNT.

Одним из самых перспективных методов, удовлетворяющих современным требованиям по скорости, чувствительности и специфичности детекции различных токсинов, является поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия (SERS). Она уже нашла применение в различных областях аналитики, в том числе и в области обнаружения опасных химических и биологических агентов [8]. В настоящее время уже предложены различные варианты обнаружения BoNT с применением SERS.

Лим с соавторами предложили вариант гетерогенного твердофазного иммунохимического анализа BoNT А и BoNT В по типу «сэндвич» [9]. Для специфического захвата антигена из аналита они использовали предметные стекла с иммобилизованными наночастицами золота и специфическими антителами к токсину. Для детекции BoNTs применяли «внешнюю рамановскую метку» (ERL). ERL представляет собой наночастицу золота с иммобилизованными на ее поверхности антителами, специфичными к BoNTs, и молекулами репортера 5.5'-дитиобис(сукцинимидил-2-нитробензоата). Предел обнаружения BoNT А предложенной системы составил 0.2–1.2 нг/мл при времени анализа не более 1 ч.

Ким и др. предложили другой вариант «сэндвича» с использованием магнитных частиц с антителами захвата [10]. В качестве детектирующего агента авторы работы использовали нанотэги, которые

аналогично предыдущей представленной работе представляют собой наночастицы золота с иммобилизованными на них специфичными к токсину антителами и молекулами репортера малахитового зеленого. Предел обнаружения предложенной системы составил порядка 0.5 нг/мл ВоNT при времени анализа не более 2 ч.

Представленные варианты иммунохимического анализа демонстрируют высокий потенциал SERS в экспресс-определении ВоNT А. Вместе с тем, использование антител в таких детекторах имеет ряд ограничений, связанных трудоемкостью их получения. Сюда следует отнести синтез антигена для иммунизации, обеспечивающего хороший иммунный ответ и высокую аффинность антител, а также длительность наработки антител (1–6 месяцев). Мы предлагаем альтернативную систему специфического определения ВоNT А с использованием аптамеров.

Аптамеры представляют собой олигонуклеотиды, способные связываться с мишенями различной природы. В отличие от антител, аптамеры синтезируются *in vitro* с использованием комбинаторного подхода, называемого SELEX (систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения), который особенно удобен при работе с токсичными веществами. Более того, аптамеры синтезируются химическим путем с возможностью обширной модификации, в том числе, с помощью меток, и других функциональных групп для создания сенсоров [11]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты

В работе были использовали неорганические соли, сахароза, Tween 80, человеческий сывороточный альбумин и гамма-глобулин (IgGHum) (AppliChem GmbH, Дармштадт, Германия и Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Все эксперименты проводились в сверхчистой воде, приготовленной на оборудовании Milli-Q (Merck KGaA, Дармштадт, Германия). Фосфатно-солевой буфер (PBS) был приготовлен из таблеток фирмы «ЭкоСервис» (Санкт-Петербург, Россия).

Ксеомин 50 единиц (Merz therapeutics, Франкфурт-на-Майне, Германия) содержит ВоNT серотипа А в сывороточном альбумине человека с сахарозой. Источник растворяли в 125 мкл раствора Рингера (Гротекс, Санкт-Петербург, Россия), получая раствор с 400 единицами/мл ВоNT, 8 мг/мл человеческого сывороточного альбумина и 38 мг/мл сахарозы. Раствор использовался сразу после приготовления. По имеющимся данным [12], 400 ЕД/мл ксеомина соответствуют 1.76 нг/мл или 11.7 пМ ВоNT серотипа А.

Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды были синтезированы твердофазным фосфорамидитным методом коммерческой компанией Синтол (Москва, Россия). Последовательности и сайты модификации представлены в табл. 1. Преформирование аптамеров проводили в PBS-буфере (рН 7,3) при нагревании при 95°C в течение 5 мин и охлаждении при комнатной температуре.

Получение SERS-подложек

SERS-подложки были получены с использованием системы тонкопленочного осаждения NANO38 (Kurt J. Lesker, США) путем нанесения наноструктурированного серебра на кремниевую пластину, покрытую слоем SiO₂ толщиной 300 нм, с формированием двух зон. Осаждение серебра номинальной толщиной 6 нм осуществляли со скоростью 0.4 А/с. После распыления подложку с двумя активными зонами SERS отжигали при 240°C в течение 6 мин на нагревательной пластине HP-20D (Daihan Scientific, Южная Корея). Таким образом, эти зоны были покрыты “наноостровками” серебра со средним планарным размером 24 нм и дисперсией 14 нм. В дальнейшем, одна из зон использовалась в качестве экспериментальной, а другая – контрольной.

Иммобилизация аптамера на подложку

На экспериментальную и контрольную зоны наносили по 10 мкл 140, 70, 35, 17.5 и 8.8 нМ раствора аптамера к ВоNT в PBS (рН 7,3). Далее подложки инкубировали в чашках Петри в течение 1 часа, затем последовательно промывали PBS, содержащим 0.01% Tween 80.

Определение оптимальной концентрации аптамера на SERS подложке

Для определения оптимальной концентрации раствора аптамера HS-Ток-Тамга готовили серию его растворов в PBS концентраций 140.0, 70.0, 35.0, 17.5 и 8.8 нМ. После преформирования при температуре 95°C и охлаждения до комнатной температуры проводили иммобилизацию аптамера на SERS-подложку. Для этого на опытную и контрольную зоны подложки наносили по 10 мкл раствора аптамера и выдерживали 1 час. Распределение интенсивности сигнала на поверхности каждой зоны определяли при помощи измерения на рамановском микроскопе.

Реакция с антигеном

На экспериментальную зону был нанесен раствор 10 мкл 2.4 нг/мл ВоNT А в PBS, содержащий 52 мг/мл сахарозы и 11 мг/мл сывороточного альбумина человека. В качестве контроля был использован раствор

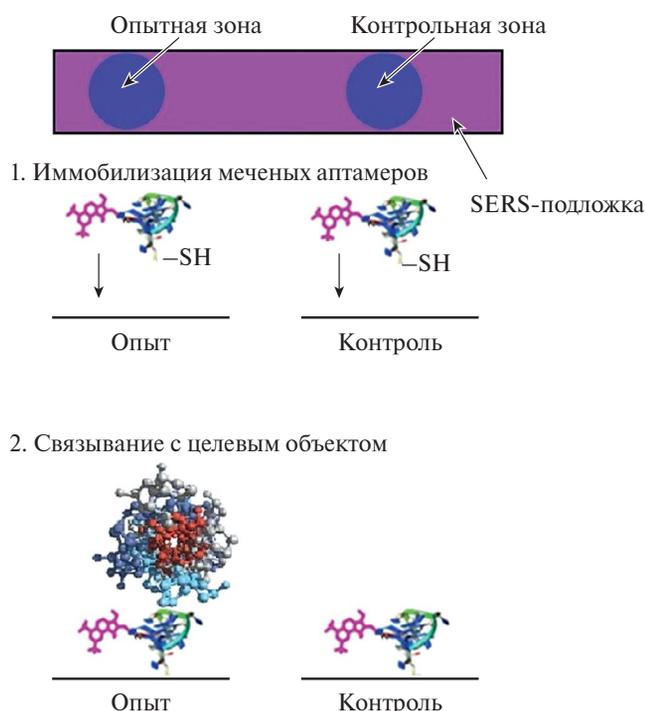


Рис. 1. Схема эксперимента.

PBS с сахарозой и альбумином тех же концентраций. Инкубирование проводили в закрытых чашках Петри в течение 1 ч, затем последовательно промывали PBS, содержащем 0.01% Tween 80, а также сверхчистой водой Milli-Q. Подложки сушили при комнатной температуре, а затем измеряли сигнал SERS.

Детектирование *BoNT A*

Для детектирования *BoNT A* использовали коммерческий препарат Ксеомин (NT 201; Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Germany) с известным содержанием токсина [11]. Для проведения опыта препарат растворяли в PBS, наносили 10 мкл раствора на опытную зону SERS-подложки и выдерживали в течение 1 ч. Общая схема реакции приведена на рис. 1. По окончании реакции последовательно промывали подложку в PBS, содержащем 0.05% Tween 80; PBS и воде, а затем проводили измерение сигнала опыта и контроля. В качестве контроля использовали раствор человеческого сывороточного альбумина и сахарозы в PBS в концентрациях, равных концентрациям этих веществ при растворении Ксеомина.

Установление специфичности связывания *BoNT A* на SERS-подложке

Для определения специфичности связывания *BoNT A* проводили две серии опытов. В первой серии в качестве мишени был использован IgG_{Hum} .

Во второй серии вместо аптамера к *BoNT*, использовали аптамер к RSV-вирусу.

Измерение SERS-сигнала

Спектры SERS получали с помощью оптического сканирующего микроскопа Olympus BX51 (Olympus Corporation, Япония) на базе спектрометра RamanLife RL532 (TeraSense Group, Inc., США, Калифорния) с длиной волны лазера 532 нм и выходной мощностью 5 мВт. Спектрометр имел спектральное разрешение 4–6 cm^{-1} и спектральный диапазон 160–4000 cm^{-1} . Диаметр лазерного пятна составлял 10 мкм. Карта распределения (2 мм × 2 мм) сигнала SERS от TAMRA по всей площади образца записывалась на объективе 10x с шагом 200 микрон в режиме XY-сканирования. В результате сканирования были записаны карты распределения интегральной интенсивности линии комбинационного рассеяния света в спектральном окне $1585 \pm 50 cm^{-1}$. Кроме того, были рассчитаны средние значения и погрешности измерений для всех измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение оптимальной концентрации аптамеров

Идея представленного в настоящей статье сенсора для определения *BoNT A* состоит в том, что при его специфическом взаимодействии с аптамером происходит снижение сигнала метки последнего (рис. 2). При достаточно низких концентрациях антигена в образце разница значений сигнала опыта и контроля может быть не очень высокой. Поэтому определение оптимальной концентрации аптамера проводили по двум критериям:

- узкое распределение интенсивности SERS-сигнала, обеспечивающее хорошую воспроизводимость результатов опытов;

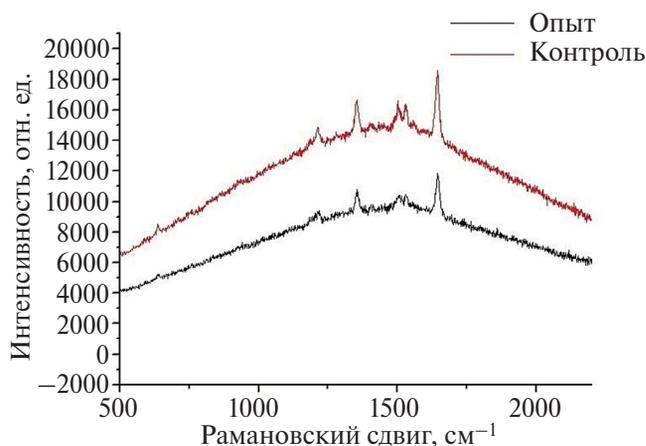


Рис. 2. Отношение интенсивности SERS-сигнала опыта и контроля.

Таблица 1. Результаты эксперимента по определению оптимальной концентрации раствора аптамера к ВоNT

Концентрация аптамера, нМ	Среднее значение интенсивности сигнала (μ), усл. ед.	Коэффициент вариации (V)
140.0	30169 ± 11790	0.39
70.0	23173 ± 7410	0.32
35.0	19324 ± 1218	0.06
17.5	7586 ± 915	0.12
8.8	3328 ± 541	0.16

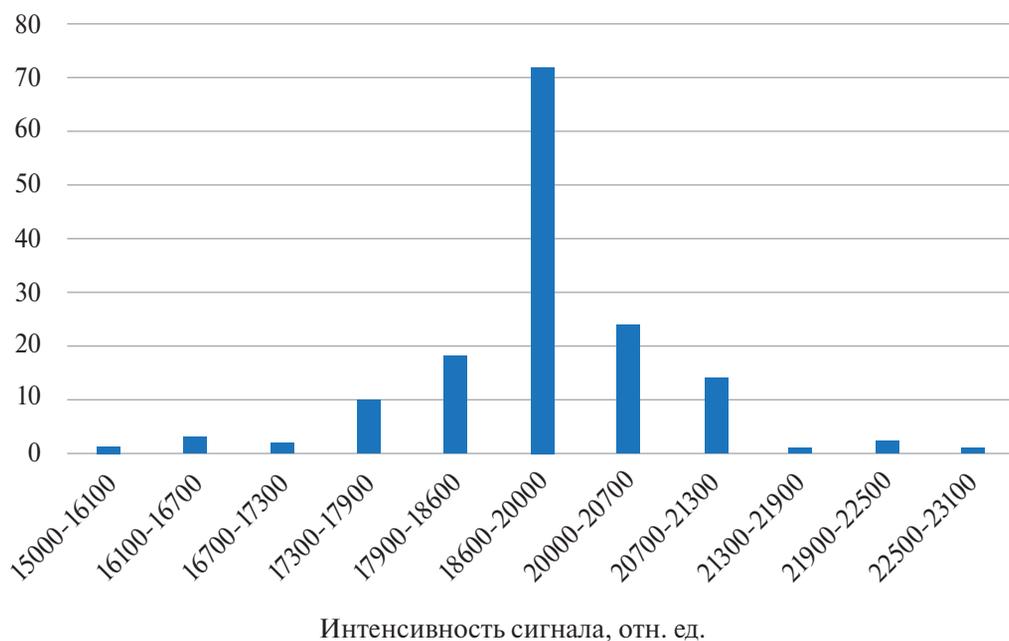


Рис. 3. Распределение интенсивности SERS-сигнала от раствора аптамеров к ВоNT с концентрацией 35.0 нМ на подложке.

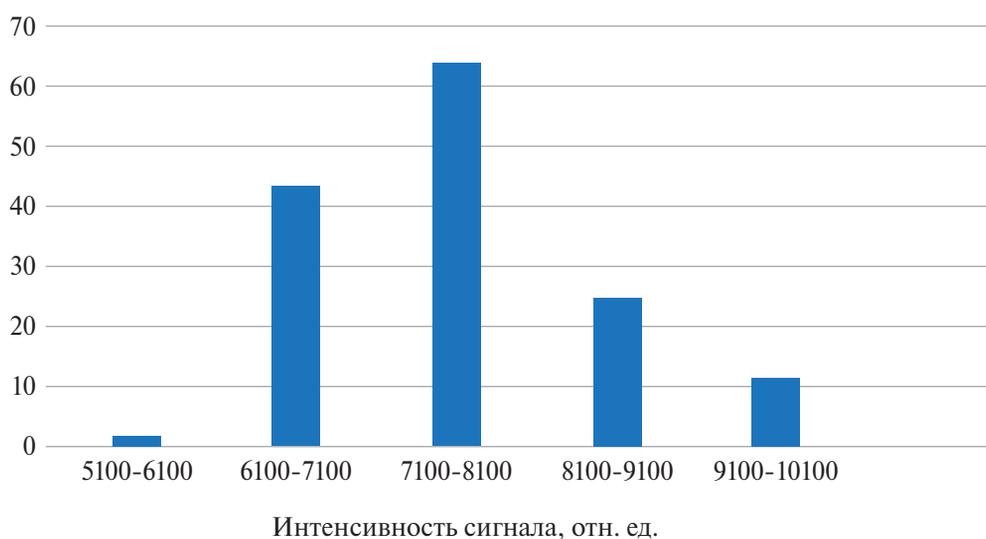


Рис. 4. Распределение интенсивности SERS-сигнала от раствора аптамеров к ВоNT с концентрацией 17.5 нМ на подложке.

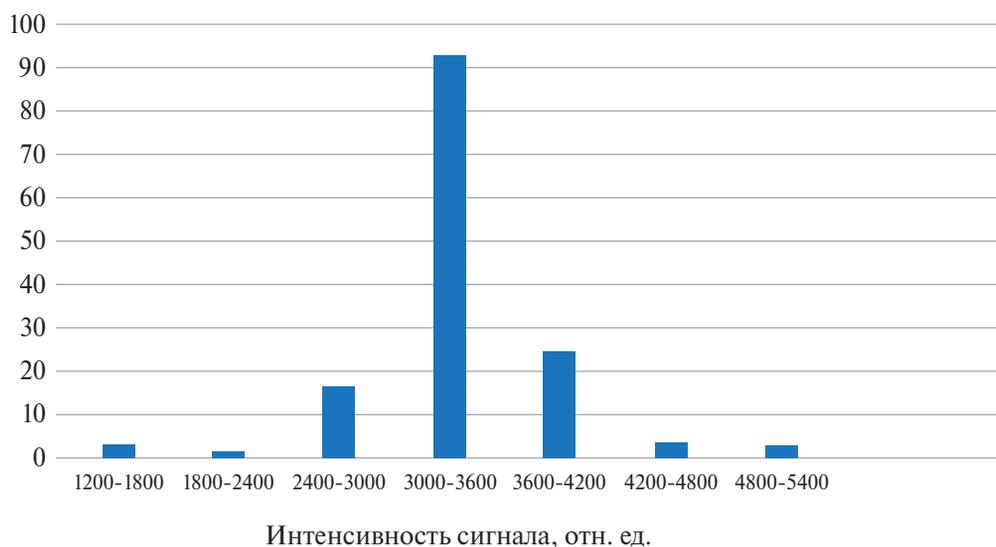


Рис. 5. Распределение интенсивности SERS-сигнала от раствора аптамеров к BoNT с концентрацией 8.8 нМ на подложке.

- среднее значение интенсивности SERS-сигнала, обеспечивающее максимально низкий предел обнаружения BoNT A.

Результаты представлены в табл. 1. Из представленных данных видно, что концентрация аптамера 35.0 нМ является оптимальной по коэффициенту вариации (всего 0.06), однако среднее значение сигнала достаточно высокое – 19324 отн. ед., что может сказаться на чувствительности сенсора. Поэтому для дальнейших экспериментов брали растворы аптамеров с концентрациями 35.0, 17.5 и 8.8 нМ. Распределения значений SERS-сигнала на субстрате для них представлены на рис. 3–5.

Детектирование BoNT A

Нами были поставлены эксперименты с концентрацией BoNT A 2.4 нг/мл. Для определения токсина мы оценивали отношение SERS опыта и контроля. В случае его специфического связывания аптамером интенсивность сигнала опыта снижалась по сравнению с таковой на контроле.

Положительным считался опыт, в котором это отличие было статистически значимым. Результаты представлены в табл. 2, откуда видно, что BoNT A статистически значимо определяется только при концентрации раствора аптамеров равной 17.5 нМ. Распределение интенсивностей SERS-сигнала для данной концентрации аптамера представлено на рис. 6.

Поскольку дальнейшее снижение концентрации BoNT A не привело к положительным результатам, мы считаем, что предел обнаружения BoNT сенсором составил 2.4 нг/мл.

Установление специфичности связывания BoNT A на SERS-подложке

Нами были поставлены аналогичные опыты с IgG_{Hum} в качестве определяемого вещества. Этот белок был выбран по причине того, что его масса практически такая же, как и у BoNT A – 150 кДа. Кроме того, если рассматривать перспективу использования предложенного нами

Таблица 2. Результаты эксперимента по определению оптимальной концентрации раствора аптамера к BoNT

Концентрация аптамера, нМ	Среднее значение интенсивности сигнала (μ), усл. ед.	Коэффициент вариации (V)
140.0	30169 ± 11790	0.39
70.0	23173 ± 7410	0.32
35.0	19324 ± 1218	0.06
17.5	7586 ± 915	0.12
8.8	3328 ± 541	0.16

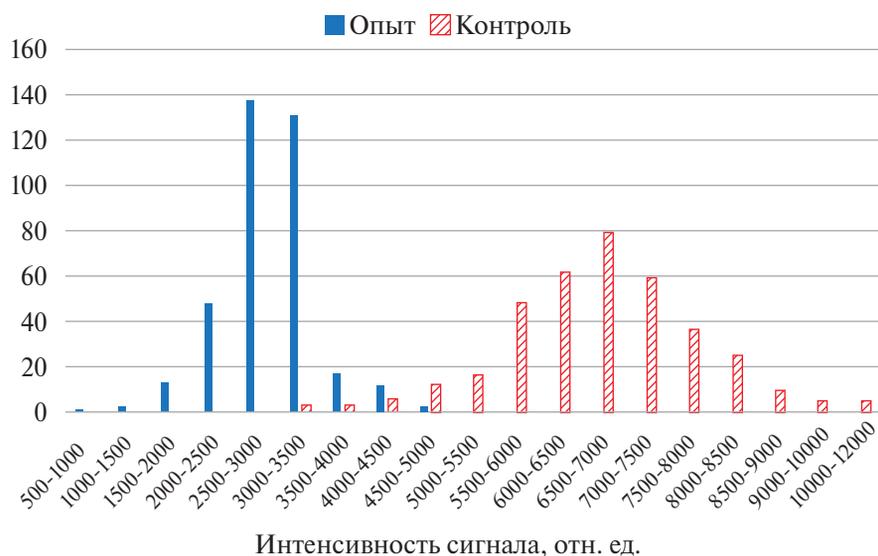


Рис. 6. Распределение интенсивности сигнала SERS опыта и контроля при определении BoNT A (2.4 нг/мл) с использованием раствора аптамеров с концентрацией 17.5 нМ на подложке.

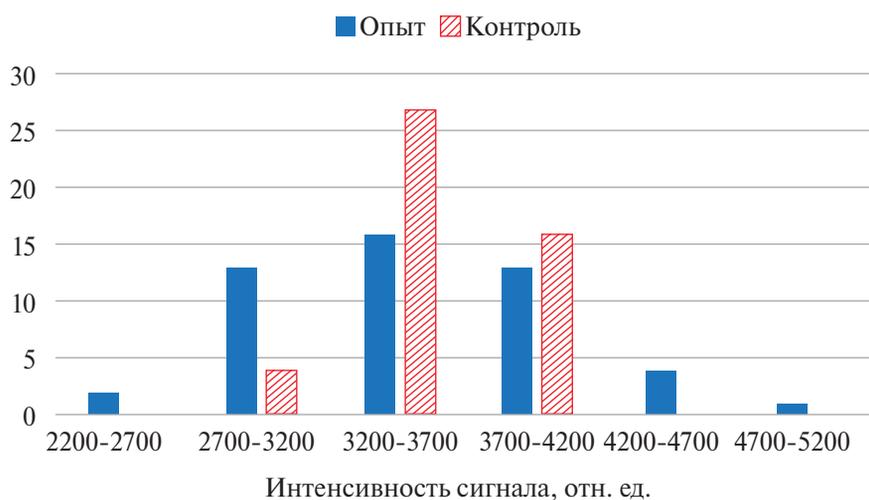


Рис. 7. Распределение интенсивности SERS опыта и контроля при определении IgGHum (24 нг/мл) с использованием раствора аптамеров к BoNT с концентрацией 17.5 нМ на подложке.

Таблица 3. Детектирование IgG_{Hum}

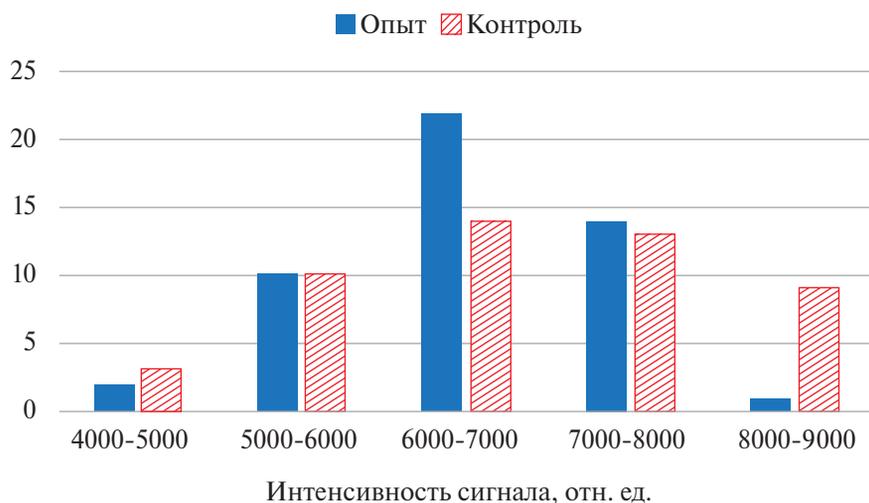
Концентрация раствора аптамеров, нМ	Значение интенсивности сигнала опыта, отн.ед.	Значение интенсивности сигнала контроля, отн.ед.	Вероятность неспецифического связывания IgG _{Hum} (концентрация 2.4 нг/мл), % ($p < 0.001$)
17.5	3465 ± 600	3528 ± 233	не более 2.5

сенсора в клинической диагностике, этот белок будет одним из «мешающих» компонентов при анализе плазмы крови. Результаты определения представлены в табл. 3, из которых видно, что соотношение SERS-сигнала опытной и контрольных

зон статистически равные. Это свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания IgG_{Hum} и используемого аптамера. Распределение интенсивности сигналов опыта и контроля представлено на рис. 7.

Таблица 4. Определение BoNT A с использованием аптамера к RSV

Концентрация раствора аптамера к RSV, нМ	Значение интенсивности сигнала опыта, отн.ед.	Среднее значение интенсивности сигнала контроля, отн.ед.	Вероятность неспецифического связывания BoNT A (концентрация 2.4 нг/мл), %
17.5	6435 ± 440	6125 ± 560	не более 2.5

**Рис. 8.** Распределение интенсивности SERS опыта и контроля при определении BoNT A (2.4 нг/мл) с использованием раствора аптамеров к RSV с концентрацией 17.5 нМ.

Нами также были поставлены опыты с аптамером к RSV. Результаты представлены в табл. 4.

Так же, как и в предыдущем опыте нами показано, что случае замены неспецифичным к BoNT A аптамером, мы не наблюдаем положительного результата при определении токсина. Распределение интенсивностей SERS представлено на рис. 8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время активно разрабатываются технологии специфического обнаружения различных веществ с использованием аптамеров в сочетании с поверхностно-усиленной рамановской спектроскопией. Был достигнут заметный прогресс в обнаружении различных биологических мишеней, таких как белковые токсины, бактерии и вирусы. В то же время одним из современных требований к таким датчикам является разработка мультиплексных платформ, позволяющих одновременно обнаруживать несколько мишеней. Следовательно, остаются актуальными вопросами оптимизация структуры платформ SERS и концентрации детектирующих аптамеров для обеспечения высокой чувствительности и разрешающей способности анализа в отношении каждого обнаруживаемого вещества.

Сенсор, показанный в данной работе, основан на использовании SERS-подложки, разработанной

по недорогой, воспроизводимой и простой технологии, которая эффективно работает при возбуждении лазером с длиной волны 532 нм. В то же время, аптамеры, используемые в качестве узнающих элементов, также, по сравнению с моноклинальными антителами, обладают невысокой стоимостью, а также относительно просто синтезируются. Биосенсор способен детектировать ботулинический токсин типа А с пределом обнаружения 2.4 нг/мл за 1 час.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-03-2023-106).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pirazzini M., Rossetto O., Eleopra R., Montecucco C. // *Pharmacol. Rev.* 2017. V. 69. P. 200.
2. Smith T.J., Hill K.K., Raphael B.H. // *Res. Microbiol.* 2015. V. 166. P. 290.
3. Rummel A. // *Toxicon.* 2015. V. 107. P. 9.
4. Tian D., Zheng T. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. 1.
5. Hill K.K., Smith T.J., Helma C.H. et al. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. No. 3. P. 818.
6. Strotmeier J., Willjes G., Binz T., Rummel A. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. P. 310.

7. *Kavalali E.T.* // *Nature. Rev. Neurosci.* 2015. V. 16. P. 5.
8. *Kamińska A., Winkler K., Kowalska A. et al.* // *Sci. Reports.* 2017. V. 7. Art. No. 10656.
9. *Lim C.Y., Granger J.H., Porter M.* // *Analyt. Chim. Acta X.* 2019. V. 1. Art. No. 100002.
10. *Kim K., Choi N., Jeon J.H. et al.* // *Sensors.* 2019. V. 19. Art. No. 4081.
11. *Yoo H., Jo H., Oh S.S.* // *Mater. Adv.* 2020. V. 1. P. 2663.
12. *Frevert J.* // *Drugs R D.* 2010. V. 10. P. 67.

Rapid detection of A-type botulinum toxin using an aptasensor and SERS

O. A. Ambartsumyan^{1,*}, A. M. Brovko¹

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, 117303 Russia*

**e-mail: ambartsumian.oa@mipt.ru*

We described the development of a biosensor for the rapid and sensitive detection of botulinum toxin type A. The sensor is a SERS substrate with an optimized concentration of labeled aptamers, immobilized on its surface. It allows the detection of botulinum toxin type A with a detection limit of 2.4 ng/ml in 1 hour.

Keywords: SERS; aptamer; biosensor; BoNT A; botulinum neurotoxin