

**Р.В. Христосенко<sup>1</sup>, Н.В. Нестерова<sup>2</sup>,  
Е.В. Костюкевич<sup>1</sup>, С.Д. Загородняя<sup>2</sup>,  
Г.В. Баранова<sup>2</sup>, А.В. Головань<sup>2</sup>,  
Ю.В. Ушенин<sup>1</sup>, А.В. Самойлов<sup>1</sup>,  
С.А. Костюкевич<sup>1</sup>**

## **ИММУНОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА—БАРР**

Разработана иммуносенсорная тест-система для определения антител против вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) на основе двухканального сенсора поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Особенностью нового сенсора является введение дополнительного контрольного канала, показания которого считываются параллельно с рабочим, что приводит к повышению точности прибора и достоверности результатов измерений. Разработана технология получения специфических компонентов тест-системы и оптимизированы условия проведения анализа — сорбции антигена на чувствительную поверхность сенсора, его взаимодействие с исследуемой сывороткой и оценка образования иммунного комплекса. Проведена оценка воспроизводимости, чувствительности и специфичности тест-системы.

**Ключевые слова:** поверхностный плазмонный резонанс (ППР), двухканальная иммуносенсорная тест-система, вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ), антитела, сыворотка крови.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Многие достижения в области исследования биохимических процессов на молекулярном уровне стали возможными вследствие стремительно развивающегося направления сенсорного приборостроения. Наиболее передовую и развитую оптическую сенсорную технологию представляют приборы на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [1]. Такая неинвазивная методика позволяет исследовать процессы молекулярного взаимодействия в реальном масштабе времени без необходимости метить материалы. При этом исследователь получает дополнительную информацию о кинетике детектируемых процессов с высокой чувствительностью и достоверностью, используя для проведения анализа малые количества пробы (микролитры) [2].

Поверхностные плазмоны (ПП) — это электромагнитные волны плотности заряда, которые можно возбудить на границе раздела между металлической и диэлектрической средами [3]. Резонансные условия связывания между ПП и электромагнитным полем возбуждающего света крайне чувствительны к изменениям оптических свойств диэлектрической среды вблизи металлической поверхности. Эти условия характеризуются явлением ППР и могут быть зафиксированы с использованием различных конфигураций возбуждения (призмное, решеточное) и методов измерения коэффициента отражения от интерфейса металл/диэлектрик, включая опрос угла падения при фиксированной длине волны света, сканирование длины волны света при фиксированном угле падения или комбинацию обоих методов.

Сенсоры ППР можно применять как высокочувствительные рефлектометры, для детектирования химических и биологических веществ,

а также для изучения молекулярного взаимодействия. Принцип работы таких сенсоров заключается в том, что чувствительный материал (т.е. массив молекулярно-распознающих элементов (МРЭ)), иммобилизованный на поверхности сенсора, специфически взаимодействует с молекулами аналита, что фиксируется прибором в виде выходного сигнала [4]. МРЭ могут быть биологическими (антитела, антигены, ферменты, ДНК), биохимическими, химическими комбинациями этих элементов или их синтетическими аналогами.

Приборы на основе ППР позволяют анализировать взаимодействие рецептор-лиганд в широком диапазоне молекулярных масс, аффинности и констант связывания. Необходимыми областями применения биосенсоров являются: диагностика болезней, мониторинг окружающей среды и клинических показателей, тестирование фармацевтических компонентов и продуктов питания, а также использование в военных системах детектирования для предупреждения террористических актов различной направленности. Однако в первую очередь исследования в области разработки сенсорных систем стимулируются потребностями медицины для мониторинга метаболитов, лекарственных препаратов и белков *in vivo*.

Исследование различных аспектов взаимодействия вирусов со специфическими агентами, а также изменений их структуры — одно из важных направлений использования методики ППР, поскольку распространение вирусных инфекций, которые отрицательно влияют на здоровье человека, стремительно возрастает [5—8]. Однако методика ППР практически не использовалась для детектирования вирусных агентов и антител непосредственно в реальной пробе (сыворотке крови) [9].

Вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ, вирус герпеса 4-го типа) вызывает у человека инфекционный мононуклеоз, с последующим поражением лимфатической и нервной систем [10]. ВЭБ может быть агентом, который вызывает хроническую усталость, аутоиммунные расстройства, а также играет важную роль в формировании опухолевых клеток в организме человека [11—15]. У многих людей, зараженных вирусом Эпштейна—Барр, болезнь протекает бессимптомно. ВЭБ, как и другие герпесвирусы, активизируется при иммунодефицитах различного генеза, в том числе ВИЧ-инфекции, онкозаболеваниях, под воздействием радиационного фактора. Есть свидетельства того, что ВЭБ сам является достаточно сильным иммуносупрессором [16].

Цель настоящей работы — исследование наличия антител (иммуноглобулинов класса G) к ВЭБ в сыворотке крови инфицированного человека с помощью двухканального биосенсора на основе ППР, что дает возможность определить заболевание и назначить эффективное лечение.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Чувствительные материалы.** Для диагностики ВЭБ-инфекции используются молекулярно-биологические методы — полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод иммунофлуоресценции, а также метод иммуноферментного анализа (ИФА) — высокочувствительный, специфичный и наиболее подходящий для масштабных исследований [17].

Вирус Эпштейна—Барр накапливали и очищали из культуры клеток В95-8 по методу Уоллза, Кроффорда [18] с модификациями авторов, подробно описанными в [19, 20]. Культура клеток В95-8 является В-лимфоцитами периферической крови обезьян-мармазеток, которые трансформированы ВЭБ и постоянно продуцируют вирус. В качестве антигена использовали лизаты лимфобластоидных клеток В95-8, которые содержали полный спектр белков ВЭБ, а именно: EBNA, EA, VCA. Таким

образом, получен специфический антиген для определения антител (IgG и IgM) к вирусу Эпштейна—Барр, который имеет высокие показатели чувствительности и специфичности. Для определения чувствительности и специфичности полученного антигена сравнивали воспроизводимость положительных и отрицательных результатов исследований отобранных панелей соответственно положительных и отрицательных сывороток в нашей тест-системе и зарубежных тест-системах с использованием ПЦР («АмплиСенс-100-R» (Россия)) и ИФА («Platelia EBV EBNA IgG» («Sanoofi diagnostics Pasteur», Франция), «SIA<sup>TM</sup> Epstein — Barr EBNA IgG» («Sigma diagnostics», США)).

**Аналиты.** В работе использованы сыворотки крови больных с лимфопролиферативными заболеваниями и инфекционным мононуклеозом ВЭБ-этиологии, предоставленные ООО «ДНК-лаборатория» (Киев), в которых подтверждено наличие ДНК ВЭБ методом ПЦР, а также сыворотки, полученные у здоровых доноров, предоставленные Станцией переливания крови (Киев).

Сыворотки больных и доноров были протестированы на наличие антител к ВЭБ с помощью референс-методов ПЦР и ИФА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Экспериментальная установка.** В работе использовали экспериментальный автоматизированный двухканальный прибор «Плазмон-6», разработанный в Институте физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАНУ. Прибор обеспечивает измерение полной ППП-кривой в угловой конфигурации по схеме Кречмана с механической разверткой угла падения в пределах  $17^\circ$  на воздухе ( $12^\circ$  в стекле) и точностью  $5''$ , а также с возможностью абсолютной калибровки по углу. Поверхностные плазмоны (ПП) в тонкой пленке золота возбуждались с помощью лазерного модуля  $p$ -поляризованного света ( $\lambda = 650$  нм) и стеклянной призмы (показатель преломления —  $n = 1,61$ , базовый угол  $65^\circ$ , базовая грань  $20 \times 20$  мм). Прибор позволяет работать с аналитами, показатель преломления которых находится в диапазоне  $1,33—1,7$ . В эксперименте измеряли угловую позицию минимума ППП во времени при адсорбции молекул-аналитов.

Особенность прибора «Плазмон-6» — это введение дополнительного контрольного канала, показания которого считываются параллельно с рабочим. Если во время продолжительных измерений происходят изменения показателя преломления аналита, не связанные с адсорбцией или взаимодействием молекул (например, изменение температуры), то будет изменяться и оклик прибора, что фиксируется с помощью референтного канала. Таким образом, модель ППП сенсора «Плазмон-6», содержащая два оптических канала, способствует повышению точности прибора и достоверности результатов измерений.

В приборе используется один источник света, луч которого разделяется на два специально разработанной светоделительной призмой. Расстояние между осями лучей составляет  $7,5$  мм. Светоделительная призма — основной элемент схемы, отвечающий за формирование двух лучей света с одинаковой поляризацией, без преломления и со смещением относительно оси излучателя. Только в таком случае в двух каналах мы получаем идентичные резонансные ППП-кривые. Выполнены теоретический расчет и оптимизация конструкции относительно размеров и взаимного расположения элементов оптического блока прибора. Оптическая схема прибора «Плазмон-6» приведена на рис. 1.

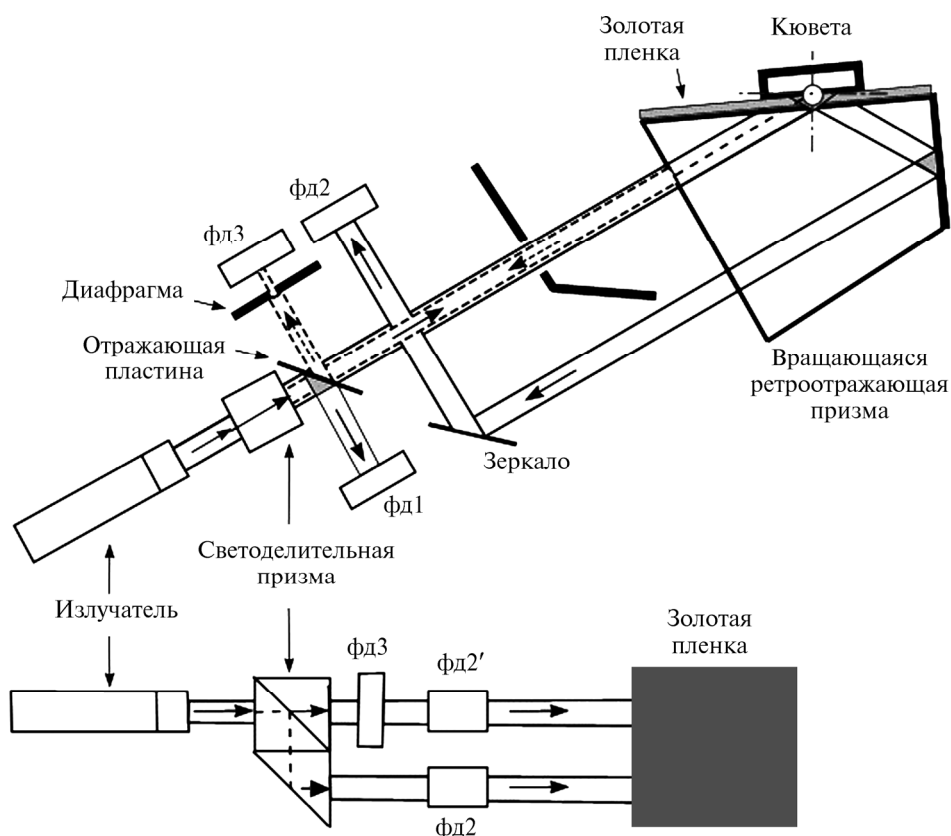


Рис. 1. Оптическая схема двухканального сенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса «Плазмон-6»

**Изготовление биочипа.** В качестве чувствительного элемента ППР-сенсора использовали пленки золота толщиной  $(45 \pm 2)$  нм на стеклянной подложке размером  $20 \times 20 \times 1$  мм с показателем преломления  $n = 1,61$ . Слой металла наносили методом термического испарения в вакууме, применяя для улучшения адгезии тонкий слой хрома ( $\sim 1$  нм).

Закрепление одной из взаимодействующих молекул на поверхности сенсорного чипа с сохранением ее нативного состояния и необходимой пространственной ориентацией активных центров является существенным моментом для получения достоверных результатов исследований и эффективной работы сенсора [21]. Поэтому изготовление биочипа для ППР-сенсора базировалось на определении оптимальных условий иммобилизации белков ВЭБ в качестве антигена на поверхности золотой пленки.

Было опробировано [22] несколько подходов к детектированию антител к ВЭБ, в частности: 1) использование для иммобилизации вирусного антигена поверхности сенсора с предварительно нанесенными смешанными монослоями тиолов; 2) иммобилизация антигена на модифицированной поверхности сенсора, после чего она обрабатывалась БСА для устранения неспецифического связывания.

Основываясь на результатах, проведенных исследований [23, 24], здесь использовали следующую методику изготовления биочипа. Для улучшения иммобилизации антигена всю поверхность чипа покрывали раствором (2 мг/мл) Dextran 17 000 (Sigma) — 0,05 % цитратный буфер, рН 5,0—5,2, затем выдерживали в течение 5 ч при комнатной температуре (20—25 °С). Промывали цитратным буфером, далее покрывали всю

обработанную поверхность раствором антигена (белки вируса Эпштейна—Барр) в цитратном буфере и выдерживали при 4—8 °С 18—24 ч. Промывали цитратным буфером и блокировали свободные места на биочипах 1 % БСА в цитратном буфере 1 ч при комнатной температуре. Биочипы промывали цитратным буфером и высушивали в потоке чистого воздуха. Готовые биочипы хранили при 4—8 °С в малых стерильных емкостях, которые заклеивали клейкой лентой в целях предохранения от воздействия воздуха.

**Детектирование антител.** В работе [25] изучалась активность анти-ВЭБ-сывороток методом ППР относительно очищенных белков ВЭБ в зависимости от рН-буфера и разведения сыворотки. Определены кинетические и концентрационные зависимости между антигенами вирусов и специфическими антисыворотками к ним при разных рН. Оптимальным для системы было выбрано разведение 1:100 при использовании цитратного буфера рН 5,0—5,5. Такой оптимизированный подход применялся в нашей работе.

Для определения сывороток, содержащих антитела против ВЭБ, использовали заранее изготовленные биочипы с иммобилизованными белками ВЭБ на поверхности золотой пленки и двухканальный прибор «Плазмон-6». Оптический контакт ППР-чипов со стеклянной призмой обеспечивали с помощью иммерсионной жидкости с показателем преломления, идентичным стеклянной подложке. Канал 1 применяли непосредственно для измерения уровня антител, а канал 2 — как контрольный для повышения точности измерений. Для исключения неспецифического связывания ВЭБ-антител сначала в проточную кювету подавали негативную сыворотку человека. Отмывали материал, который не связался (цитратный буфер рН 5,5), и пропускали сыворотку крови больного с ВЭБ-инфекцией. Учет результатов взаимодействия антиген-антитело осуществляли, количественно определяя сдвиг резонансного угла (в угловых секундах) во времени (секунды). Типичная сенсограмма измерений представлена на рис. 2.

При разработке иммуносенсора граничное значение (ГЗ) рассчитывали из среднего значения сдвига резонансного угла для 25 негативных сывороток при трех измерениях на каждую. Далее, при проведении анализа сыворотка считалась позитивной, если значение показателя отклонения резонансного угла превышало ГЗ на 10 %. В случае, если значение показателя отклонения резонансного угла было ниже ГЗ на 10 %, сыворотка считалась негативной. Данные, полученные в иммуносенсорной ППР тест-системе, сравнивали с результатами иммуноферментного анализа.

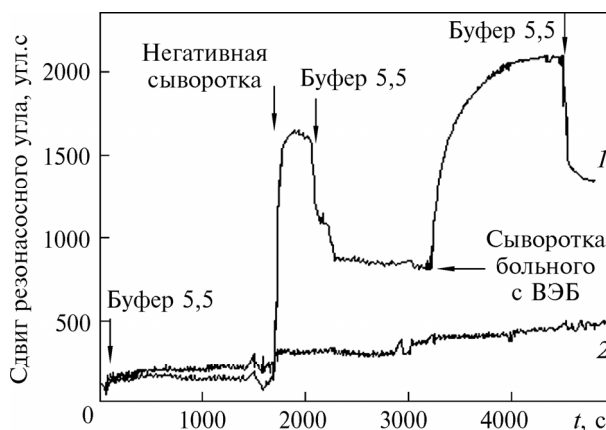


Рис. 2. Сенсограмма взаимодействия специфического антигена, закрепленного на золотой поверхности ППР-чипа, с антителами к ВЭБ, находящимися в сыворотке крови человека. Эксперимент проведен с помощью двухканального сенсора «Плазмон-6»: 1 — рабочий канал; 2 — контрольный канал

Для разработанной иммуносенсорной тест-системы вычисляли чувствительность и специфичность. Чувствительность определяется как отношение количества сывороток, имеющих позитивные результаты при анализе, к количеству ошибочно негативных результатов, которое выражается в процентах. Чувствительность составила 98 %. Специфичность — это отношение количества сывороток, показывающих негативный результат при анализе, к количеству ошибочно позитивных результатов, которое выражается в процентах. Специфичность составила 100 %. Все сыворотки тестировали в трех повторах. Результаты анализа полученных данных свидетельствуют о их достаточно высокой воспроизводимости (95 %).

## **ВЫВОДЫ**

В работе продемонстрирована возможность определения специфических антител против вируса Эпштейна—Барр в сыворотках крови человека с помощью двухканального оптического сенсора на основе явления поверхностного плазмонного резонанса «Плазмон-6». Особенностью нового прибора является введение дополнительного контрольного канала, показания которого считываются параллельно с рабочим, что приводит к повышению точности прибора и достоверности результатов измерений.

Разработана технология получения специфического антигена для определения антител к ВЭБ, подобраны условия и последовательность проведения анализа. Изготовление биочипов для проведения анализов заключалось в иммобилизации на золотой сенсорной поверхности белков ВЭБ в качестве антигена. При иммобилизации антигена использовали переходную пленку декстрана ((2 мг/мл) Dextran 17 000 (Sigma) — 0,05 % цитратный буфер, рН 5,0—5,2). Для предотвращения неспецифического взаимодействия после иммобилизации белков ВЭБ места свободные от белка блокировали с использованием 1 % БСА(BSA) в цитратном буфере. Исследования с помощью заранее изготовленных биочипов проведены на 25 сыворотках с 3-кратным измерением каждой. Проведена оценка воспроизводимости, чувствительности и специфичности разработанной иммуносенсорной ППР тест-системы на основе параллельных результатов иммуноферментного анализа.

Таким образом, ППР-методику (особенно в двухканальной модификации) можно использовать для проведения иммунологических исследований населения на определение антител к вирусу Эпштейна—Барр в крови больных, наряду с иммуноферментным анализом. Преимуществом использования ППР-методики является быстрое получение информации в реальном масштабе времени относительно этиологического возбудителя заболевания, отсутствие необходимости использования меченых реагентов и автоматизированное проведение анализа.

**R.V. Khristosenko, N.V. Nesterova, Ye.V. Kostyukevych,  
S.D. Zagorodnyaya, G.V. Baranova, A.V. Golovan',  
Yu.V. Ushenin, A.V. Samoilov, S.A. Kostyukevych**

### **IMMUNE-SENSOR BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE FOR DETERMINING ANTIBODIES AGAINST EPSTEIN-BARR VIRUS**

The immune-sensor test-system to determine antibodies against Epstein-Barr virus is developed in this work. The system is based on a two-channel surface plasmon resonance sensor. The main feature of this new sensor is an additional reference channel, data of which are read out in parallel with the operational one. It leads to an increase of this device accuracy as well as to reliability of the data obtained. The technology for preparation of specific components related with this test-system is also developed and conditions

are optimized for performing analysis: antigene sorption on the sensitive sensor surface, its interaction with the studied blood serum and estimation of immune complex creation. Reproduceability, sensitivity and specificity of this test-system have been estimated.

**Keywords:** surface plasmon resonance (SPR), two-channel immune-sensor test-system, Epstein-Barr virus (EBV), antibody, blood serum.

1. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors* (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors) / Ed. by J. Homola. — Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 2006. — 251 p.
2. *Davies J.* Surface plasmon resonance — the technique and its applications to biomaterial processes // *Nanobiology*. — 1994. — **3**. — P. 5—16.
3. *Поверхностные поляритоны* / Под ред. В.М. Аграновича, Д.Л. Миллса. — М.: Наука, 1985. — 525 с.
4. *Ramsden J.J.* Optical biosensors // *J. Molecular Recognition*. — 1997. — **10**. — P. 109—120.
5. *Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology* / M.J. Gomara, G. Ercill, M.A. Alsina et al. // *J. Immunol. Methods*. — 2000. — **246**. — P. 13—24.
6. *Rajo N., Ercilla G., Haro I.* GB virus C (GBV-C)/hepatitis G virus (HGV): Towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection // *Current Protein and Peptide Science*. — 2003. — **4**, N 4. — P. 291—298.
7. *Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and 2 by surface plasmon resonance* / C. Wittekindt, B. Fleckenstein, K. Wiesmuller et al. // *J. Virol. Methods*. — 2000. — **87**. — P. 133—144.
8. *Детекция поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью оптического биосенсора* / Ю.Д. Иванов, О.В. Гнеденко, В.А. Конев и др. // *Вопросы мед. химии*. — 2001. — № 4. — С. 1—7.
9. *Болтовець П.М., Нестерова Н.В.* Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // *Мікробіол. журн.* — 2006. — **68**, № 3. — С. 86—98.
10. *Kawa K.* Epstein-Barr virus-associated diseases in humans // *Int. J. Hematol.* — 2000. — **71**, N 2. — P. 108—117.
11. *Kutok J.L., Fang F.* Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases // *Annu. Rev. Mech. Dis.* — 2006. — **4**, N 1. — P. 375—404.
12. *Junker A.K.* Epstein-Barr Virus // *Pediatrics in Review*. — 2005. — **26**, N 3. — P. 79—84.
13. *Matthew P. Thompson and Razelle Kurzrock.* Epstein-Barr Virus and cancer // *Clinical Cancer Research*. — 2004. — **10**, N 3. — P. 803—813.
14. *Murray P.G., Young L.S.* The role of the Epstein-Barr Virus in human disease // *Front. Biosci.* — 2002. — **2**, N 3. — P. 519—540.
15. *Khanna R., Burrows S.R.* Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases // *Microbiol. Revs.* — 1995. — N 9. — P. 387—405.
16. *Godstall S.E., Kirchner J.T.* Infectious mononucleosis. Complexities of common syndrome // *Postgrad. Med.* — 2000. — **107**, N 7. — P. 175—186.
17. *Теорія і практика імуноферментного аналізу* / А.Е. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев и др. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с.
18. *Уоллз Э., Крофорд Д.* Культивирование клеток В95-8 // *Лимфоциты. Методы*. — М.: Мир, 1990. — С. 230—249.
19. *Конструювання імуноферментної тест-системи «ІФА-АтВЕБ-СТРИП» для виявлення антитіл проти вірусу Епштейна—Барр* / С.Д. Загородня, Н.В. Нестерова, Н.С. Дяченко та ін. // *Мікробіол. журн.* — 2001. — **63**, № 4. — С. 61—69.
20. *Технологія отримання специфічного антигена для імуноферментної тест-системи на антитела к вірусу Епштейна—Барр и критерии ее качества* / Н.В. Нестерова, Н.С. Дяченко, С.Д. Загородня и др. // *Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. «Новые технологии получения и применения биологически активных веществ»*. — Симферополь: Изд-во КНЦ, 2002. — С. 118.
21. *O'Shannessy D.J., Brigham-Burke M., Peck K.* Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector // *Anal. Biochem.* — 1992. — **205**. — P. 132—136.
22. *Розробка біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для визначення антигенів та специфічних антитіл на моделі вірусу Епштейна—Барр та аденовірусу людини 2-го типу* / Н.В. Нестерова, П.М. Болтовець, Л.М. Носач та ін. // *Матеріали конф. «Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій»*. — 2005. — С. 76.

23. *Імуносенсорна* тест-система для діагностики захворювань, спричинених вірусом Епштейна—Барр / Г.В. Баранова, Н.В. Нестерова, С.Д. Загородня та ін. // Матеріали XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.В. Виноградського, Ужгород, 25—30 травня 2009 р. — С. 492.
24. *Пат. 51125 Україна, МПК А61К 31/505*. Імуносенсорна тест-система на основі поверхневого плазмонного резонансу для виявлення антитіл проти вірусу Епштейна—Барр / Н.В. Нестерова, С.Д. Загородня, Г.В. Баранова та ін. — Опубл. 12.07.2010, Бюл. № 13.
25. *Разработка* оптических иммуносенсоров на основе поверхностного плазмонного резонанса для определения специфических антител и антигенов вируса Эпштейна—Барр и аденовируса человека / Н.В. Нестерова, Л.М. Носач, С.Д. Загородня и др. // *Мікробіол. журн.* — 2008. — 70, № 6. — С. 67—73.

<sup>1</sup> Інститут фізики напівпровідників  
ім. В.Е. Лашкарева  
НАН України  
Проспект Науки, 41  
03028 Київ

Получено 24.04.2011

<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д.К. Заболотного  
НАН України  
Ул. Заболотного, 154  
03143 Київ