

DETEKCE PROTEINOVÝCH BIOMARKERŮ POMOCÍ LATERAL FLOW TESTŮ S FOTON-UPKONVERZNÍMI NANOČÁSTICEMI

ELIŠKA MACHÁČOVÁ a ZDENĚK FARKA

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, 625 00 Brno, Česká republika
machacova@mail.muni.cz

Klíčová slova: foton-upkonverzní nanočástice, UCNPs, imunostanovení, ELISA, ULISA, lidský sérový albumin, HSA, diagnostický proužek, LFIA

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220335>

Úvod

Citlivá detekce klinicky významných analytů je důležitá pro včasné odhalení onemocnění a zahájení léčby. Díky vysoké specifitě jsou v dnešní době pro zjištění přítomnosti a koncentrace biomarkerů v klinických vzorcích často využívána imunochemická stanovení založená na interakci protilátky s antigenem. Mezi nejrozšířenější patří enzymové stanovení ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), které využívá enzymem značené protilátky poskytující po reakci se substrátem barevný signál. Značky na bázi enzymů mají ovšem řadu nevýhod, jako jsou vysoké náklady na jejich přípravu, omezená stabilita nebo nedostatečná citlivost. Pro překonání těchto nedostatků se v dnešní době hledají alternativní značky; jako jedna z vhodných možností se jeví použití nanomateriálů, např. foton-upkonverzních nanočástic (UCNPs).

UCNPs jsou nanokrystaly složené z anorganické matrice (nejčastěji NaYF_4), která je dopovaná lanthanoidy. Díky této struktuře vykazují anti-Stokesovu luminiscenci (excitaci pomocí blízkého infračerveného záření a emisi ve viditelné oblasti), která zajišťuje detekci s minimálním autofluorescenčním pozadím. Pro biologické aplikace je nutné UCNPs modifikovat připojením specifické protilátky. Připravené biokonjugáty mohou být využity jako alternativa k enzymovým značkám ve stanovení ULISA (upconversion-linked immunosorbent assay). S využitím metody ULISA lze dosáhnout 10–100× citlivější detekce než v případě metody ELISA¹, nevýhodou obou těchto metod je ovšem časová náročnost. Proto je třeba využít výhodných vlastností ULISA stanovení a převést je do podoby rychlého diagnostického imunotestu.

V současné době většina rychlých diagnostických testů využívá principu laterálního toku (lateral flow immunoassay, LFIA). Takový test má typicky podobu diagnostického proužku a jako značku používá konjugáty zlatých nanočástic. Zlaté nanočástice ovšem často omezují výslednou citlivost, použitím konjugátu UCNPs může být citlivost detekce zvýšena. Mezi největší výhody LFIA testů

patří rychlost a jednoduchost provedení analýzy, jejich nízká cena a spotřeba malého množství vzorků. Vzhledem k tomu, že k provedení analýzy není potřeba sofistikovaného vybavení, lze analýzu provádět i mimo laboratoř a jedná se o tzv. „point-of-care“ diagnostickou metodu. Diagnostický proužek se skládá z několika membránových segmentů – oblast pro vzorek a konjugátová, migrační a absorpční část. Každý segment je založen na odlišném typu membrány, přičemž nejdůležitější je nitrocelulosa membrána nacházející se v migrační oblasti, kde jsou imobilizovány protilátky specificky vázající analyt. Skleněná membrána v konjugátové oblasti pak slouží pro zachycení konjugátu nanočástic s protilátkou, který zajišťuje signál pro vyhodnocení analýzy.

Cílem naší práce je vyvinout LFIA test s využitím konjugátů UCNPs pro detekci lidského sérového albuminu (human serum albumin, HSA). Nízké koncentrace HSA v moči se vyskytují u tzv. mikroalbuminurie, která značí počínající diabetickou nefropatii u dlouhodobého nebo nekontrolovatelného diabetu². Jednoduchá a citlivá detekce HSA je tak důležitá pro včasné odhalení nemoci a zabránění nevratného poškození ledvin. Pro průběh analýzy je třeba optimalizovat jednotlivé kroky – volba reagensů a jejich vhodná koncentrace, různé druhy membrán, porovnání rozdílného blokování atd. Na základě získaných informací bude sestaven LFIA test, který bude dále optimalizován pro detekci HSA v reálných vzorcích.

Experimentální část

Materiál

NHS-dPEG₈-azid a SuperBlock TBS (SB) byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific (USA), alkyln-PEG-NHS od firmy Iris Biotech (Německo). Lidský sérový albumin (HSA) a polyklonální králičí anti-HSA protilátka od firmy Sigma-Aldrich (USA), monoklonální myší anti-HSA protilátka (AL-01) od firmy EXBIO (ČR), a polyklonální kozi anti-myší protilátka od firmy Jackson ImmunoResearch (Velká Británie).

Dále byl použit fosfátový pufr (PB; 50mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4), fosfátem pufrovaný solný roztok (PBS; 50mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4, 150 mM NaCl), Tris pufr (50 mM Tris, 0,05% NaN_3 , pH 7,5), Trisem pufrovaný solný roztok (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% NaN_3 , pH 7,5), promývací pufr (WASH; 50 mM Tris, 0,05% NaN_3 , 0,05% Tween 20, 1 mM KF, pH 7,4), pufr pro adsorpci reagensů (coating buffer, CB; 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, 0,05% NaN_3 , pH 9,6), pufr pro provedení jednotlivých kroků imunostanovení (assay buffer, AS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM KF, 0,5% PEG, 0,05% Tween 20, 0,05% NaN_3 , 10% SB, pH 7,5) a dialyzační

pufr (50 mM Tris, 0,05% NaN_3 , 1 mM KF, pH 7,4).
Příprava konjugátů UCNPs s protilátkou

Syntéza nanočástic – Zárodečné nanočástice (NaYF_4 dopovaný 18% Yb^{3+} a 2% Tm^{3+} , 250 mg) byly rozpuštěny v 5,5 ml kyseliny olejové a 17 ml oktadek-1-enu a zahřívány na 300 °C v dusíkové atmosféře. Do horké disperze byly poté vstříkovány prekurzory trifluoroctanu, které iniciovaly růst nanočástic.

Příprava alkyn-PEG-Ner linkeru – 30 mg neridronátu v NaOH (1 M, 128 μl) bylo po přidání 368 μl PB smícháno s 500 μl alkyn-PEG-NHS v PB a směs byla inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla provedena dialýza proti destilované vodě pomocí dialyzačního zařízení Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 500–1000 Da; Carl Roth, Německo), lyofilizace roztoku a jeho uchování při 4 °C.

Příprava konjugátu alkyn-PEG-Ner-UCNP – 10 mg UCNPs bylo rozpuštěno v cyklohexanu a smícháno s 200 mM HCl v poměru 1:1 (v/v). Po sonikaci, odebrání horní fáze, přidání acetonu a následné centrifugaci byl pelet UCNPs rozpuštěn v destilované vodě (500 μl) a smíchán s rozpuštěným alkyn-PEG-Ner linkerem. Směs byla inkubována přes noc při 38 °C. Poté byl konjugát purifikován proti destilované vodě s 1 mM KF pomocí Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 100 kDa) a uchován při 4 °C.

Příprava click-reaktivních proteinů – S využitím NHS-dPEG₈-azid linkeru byla připravena azidem modifikovaná protilátka AL-01. Byla připravena reakční směs obsahující 1,96 μl NHS-dPEG₈-azidu (200 mM) v DMF, 200 μl protilátky rozpuštěné v PB (2,5 mg ml^{-1}) a 150 μl PB. Po 2 h inkubace byla reakce zastavena přidáním 50 μl Tris pufru a výsledný konjugát byl purifikován pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra (MWCO: 30 kDa, Carl Roth, Německo).

Click-konjugace s protilátkou – Do roztoku konjugátu alkyn-PEG-Ner-UCNPs (10 mg v 1,4 ml destilované vody) bylo přidáno 100 μl Tris pufru (375 mM, pH 7,5) a 20 μl vodného roztoku askorbátu sodného (20 mg ml^{-1}). Po probublání směsi pomocí argonu bylo přidáno 100 μl azidem modifikované protilátky AL-01 v PB (1 mg ml^{-1}). Click-reakce byla zahájena přidáním 10 μl vodného roztoku CuSO_4 (6,25 mM) a po probublání směsi argonem bylo přidáno dalších 10 μl CuSO_4 . Nakonec byla provedena dialýza (MWCO: 300 kDa) proti dialyzačnímu pufru.

Sestavení diagnostických proužků a provedení LFIA stanovení

Pro vytvoření diagnostických proužků byly použity membrány od firmy Cytiva (Německo), které byly nastříhány na optimalizované délky: celulosová membrána pro aplikaci vzorku (Fusion5) – 1 cm, celulosová absorpční membrána (CF5) – 3 cm, skleněná membrána (ST17, ST14 nebo Fusion5) – 0,5 cm a nitrocelulosová membrána (120 HP Plus Thick nebo jiná dle optimalizace) – 2,5 cm. Nitrocelulosová membrána a celulosová membrána pro absorpci byly připevněny pomocí oboustranné lepicí pásky

na plastový podklad, skleněná membrána a celulosová membrána pro aplikaci vzorku byly nalepeny dodatečně po blokovacím kroku. Při sestavování proužků se dbalo na dodržení překryvů jednotlivých membrán o 1 mm. Splepené membrány byly nastříhány na jednotlivé proužky o šířce 0,5 cm.

Na nitrocelulosovou membránu byl nanesen testovací spot 1 μl anti-HSA protilátky (0,5 mg ml^{-1}) a kontrolní spot 1 μl anti-myši protilátky (0,4 mg ml^{-1}) v CB pufru nebo v pufru dle optimalizace. Membrána byla následně inkubována přes noc za pokojové teploty. Pro vyvážení volných vazebních míst bylo provedeno blokování membrány pomocí 50% SB ve WASH, testy byly vysušeny 1 h při 37 °C. Mezitím bylo na skleněnou membránu nanášeno 10 μl UCNPs konjugátu (500 \times zředěného v Tris pufru s 5% sacharóou nebo v pufru dle optimalizace), následovala inkubace 1 h při 37 °C.

Hotové testy byly ponořeny do 100 μl AS obsahující HSA (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, koncentrace stejná pro všechny optimalizace) na 15 min. Následně byly testy dvakrát promyty pomocí WASH (100 μl , 15 min) a vysušeny při 37 °C. Pro vyhodnocení analýzy byla použita foton-upkonverzní čtečka Upcon S-Pro (Labrox, Finsko).

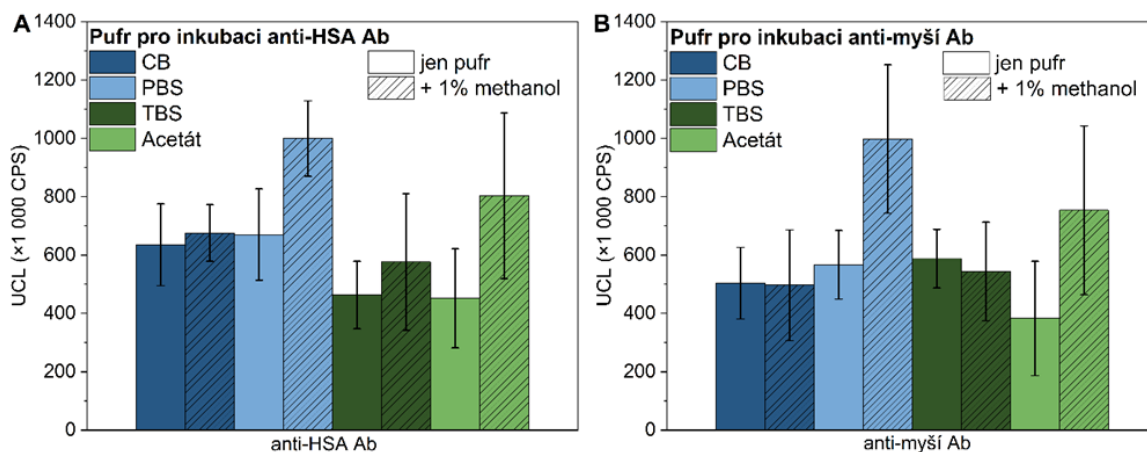
Výsledky a diskuse

Optimalizace podmínek pro imobilizaci protilátek

Vhodné podmínky imobilizace protilátek jsou pro provedení imunostanovení zásadní, proto mezi první optimalizace patřilo právě porovnání pufrů pro vazbu protilátek na nitrocelulosovou membránu. Všechny pufrы byly sledovány i s přidavkem methanolu (1 %), který by měl přispívat k lepšímu zachycení konjugátu na membráně³. CB a TBS vykazovaly pro protilátku v případě LFIA stanovení nízké signály. Jednoznačně nejvyšší signály byly dosaženy s PBS a acetátovým pufrém ovšem v obou případech pouze v kombinaci s 1% methanolem (obr. 1). Acetátový pufr s 1% methanolem byl proto zvolen jako nejvhodnější varianta pro další experimenty.

Optimalizace podmínek pro nanášení konjugátu UCNPs na skleněnou membránu

Aby byl signál pro vyhodnocení LFIA testů dostatečný, bylo nutné zajistit ideální podmínky pro uvolnění konjugátu UCNPs ze skleněné membrány. Proto byly pro inkubaci konjugátu porovnány různé druhy pufrů a skleněných membrán. Jako nevhodné se ukázalo použití membrány Fusion 5, u které nedocházelo k téměř žádnému uvolnění konjugátu do dalších částí proužku. Kvůli tomu zde byl pozorovatelný výrazný signál zakoncentrovaného konjugátu na počátku proužku a nízké signály spotů protilátek (obr. 2A). U membrány ST14 docházelo k nerovnoměrnému uvolnění konjugátu, což způsobovalo vysoké pozadí analýzy. Nejvhodnější variantou proto bylo použití membrány ST17, kde bylo pozorováno jak nízké pozadí, tak i dostatečné uvolnění konjugátu.

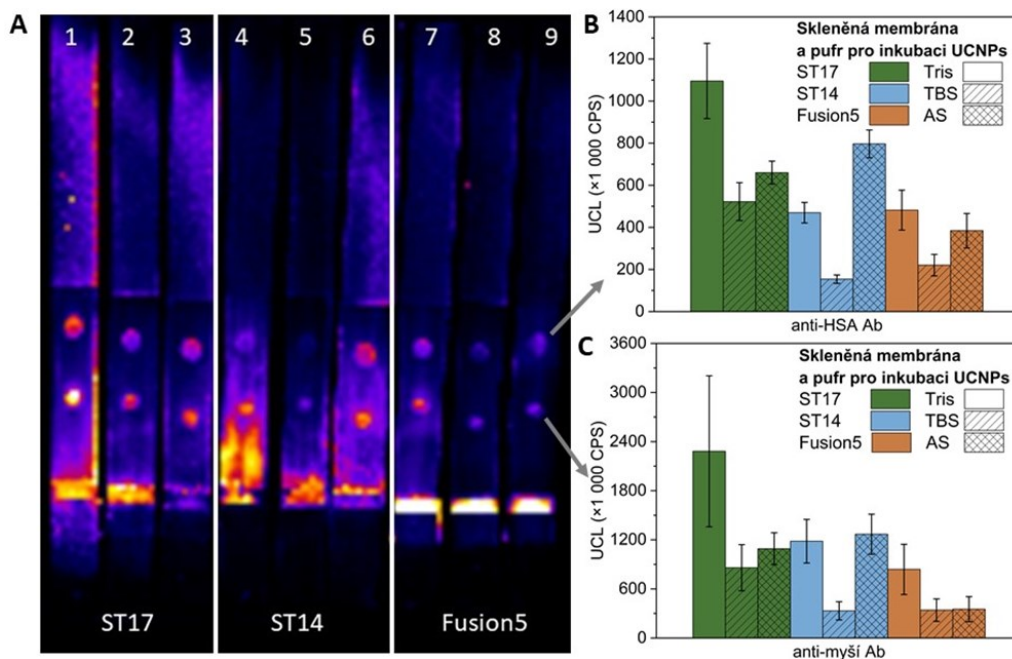


Obr. 1. **Optimalizace podmínek pro imobilizaci protilátek.** Signály testovaných pufřů bez nebo s přidavkem 1% methanolu pro imobilizaci (A) anti-HSA a (B) anti-myší protilátky

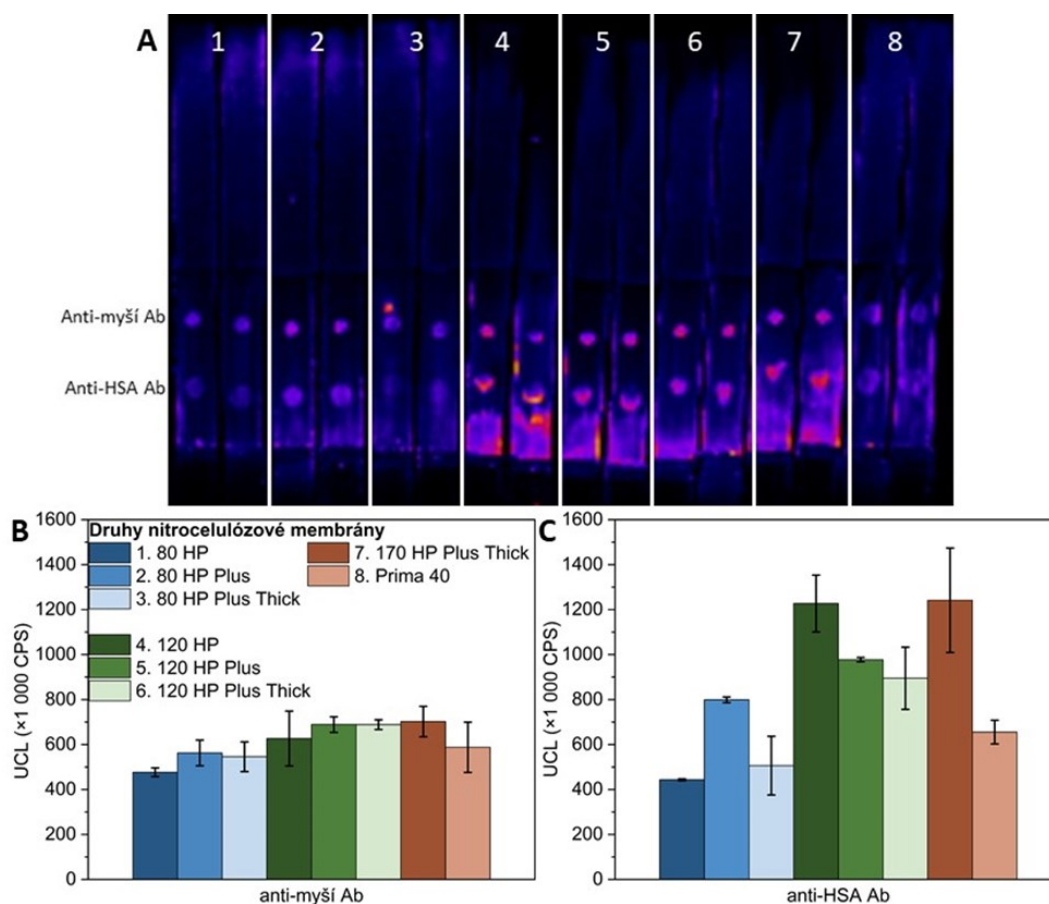
Dále byla provedena optimalizace pufřů pro nanesení konjugátu UCNPů na skleněnou membránu. Všechny testované pufře obsahovaly přidavek sacharosu (5 %), která přispívá k lepšímu uvolnění konjugátu z membrány⁴. Na obr. 2B a 2C je možné pozorovat v případě membrány ST17 nejvyšší signál pro Tris pufř. Pro další experimenty byl tak pro ředění a inkubaci konjugátu UCNPů použit Tris pufř s přidavkem sacharosu.

Optimalizace nitrocelulosové membrány

S využitím dříve optimalizovaných podmínek byly porovnány různé druhy nitrocelulosových membrán. U analýzy se podařilo snížit pozadí (obr. 3A), slabě zvýšené pozadí je pozorovatelné pouze u membrán 120 HP a 120 HP Plus, které se ale – kvůli špatnému laterálnímu toku – stejně ukázaly jako nevhodné. Vzhledem k větším pórům u membrán typu 80 HP docházelo k lepšímu toku konjugátu UCNPů do absorpční oblasti na konci testu, což



Obr. 2. **Porovnání skleněných membrán a pufřů pro inkubaci UCNPů.** (A) Upkonverzní sken LFI proužků se skleněnou membránou ST17 pro pufř Tris (1), TBS (2), AS (3), ST14 pro pufř Tris (4), TBS (5) a AS (6) a Fusion5 pro pufř Tris (7), TBS (8), AS (9). Integrované signály spotů při použití odlišných pufřů pro inkubaci UCNPů pro (B) anti-HSA a (C) anti-myší protilátku



Obr. 3. **Optimalizace nitrocelulózové membrány pro LFIA stanovení.** (A) Upkonverzní sken LFIA proužků s různými druhy nitrocelulózových membrán (čísla membrán v panelu A odpovídají číslům v panelu B) a výsledné signály pro (B) anti-myší a (C) anti-HSA protilátka

mělo pozitivní vliv na pozadí analýzy. Zároveň ale také docházelo ke snížení signálu, jak je pozorovatelné na obr. 3B a 3C. Pro finální podobu LFIA proužku je tedy výhodné využití membrány 120 HP Plus Thick, případně 170 HP Plus Thick, které poskytují kompromis mezi dostatečnou intenzitou signálu a nízkým pozadím. Volba nitrocelulózové membrány ovšem neměla na LFIA stanovení tak velký vliv jako zbylé parametry.

Závěr

S využitím konjugátů UCNPs se podařilo optimalizovat LFIA stanovení pro detekci HSA. Pro analýzu byla využita specifická anti-HSA protilátka a kontrolní anti-myší protilátka. Jako vhodný pufr pro imobilizaci protilátek byl zvolen acetátový pufr s přidávkou 1% methanolu. Pro výsledné vyhodnocení analýzy bylo potřeba zajistit vhodné podmínky pro inkubaci a uvolnění konjugátu UCNPs ze skleněné membrány, zde se jako nejlepší kombinace ukázalo využití skleněné membrány ST17 a Tris

pufru s 5% sacharosou. Volba odlišné nitrocelulózové membrány pak měla na vývoj imunostanovení relativně malý vliv, nejvýhodnější se ukázalo použití membrány 120 HP Plus Thick. S optimalizovanými podmínkami LFIA došlo ke snížení pozadí analýzy a dostatečné odezvě signálu, což ukazuje na potenciál využití UCNPs jako alternativní značky v LFIA stanoveních. Dále byla úspěšně demonstrována schopnost detegovat HSA, a proto bude dalším krokem analýza reálných vzorků obsahujících různé koncentrace HSA, aby byl ověřen praktický potenciál metody pro klinické účely.

LITERATURA

- Peltomaa R., Farka Z., Mickert M. J., Brandmeier J. C., Pastucha M., Hlaváček A., Martínez-Orts M., Canales Á., Skládal P., Benito-Peña E., Moreno-Bondi C. M., Gorris H. H.: *Biosens. Bioelectron.* **170**, 112683 (2020).
- Zangheri M., Di Nardo F., Mirasoli M., Anfossi L., Nascetti A., Caputo D., De Cesare G., Guardigli M.,

- Baggiani C., Roda A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8869 (2016).
- Geballa-Koukoulou A., Gerssen A., Nielen M. W. F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 7547 (2020).
 - Koczula K. M., Gallotta A.: *Essays Biochem.* 60, 111 (2016).

E. Macháčová and Z. Farka (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic*): **Detection of Protein Biomarkers Using Lateral Flow Tests with Photon-upconversion Nanoparticles**

Rapid and sensitive detection of clinically important analytes is crucial for early disease diagnosis and initiation of treatment. Immunochemical assays are widely used to determine the presence and concentration of analytes in various complex media due to their high specificity provided by antibodies. Recently, lateral flow immunoassays (LFIAs) are becoming one of the most popular forms of immunochemical assays. LFIAs are test strips based on nitrocellulose membranes, and their most significant advantage is that there is no need for laboratory equipment to perform the assay enabling their use for point-of-care testing. Most LFIAs are based on gold nanoparticles; howev-

er, they often limit the resulting sensitivity of LFIAs. Our work focused on photon-upconversion nanoparticles (UCNPs) as a sensitive alternative label. UCNPs are lanthanide-based nanocrystals exhibiting anti-Stokes luminescence (excitation by the NIR laser and detection in the Vis region), which allows detection without optical background interference. We have developed an LFIA assay for human serum albumin (HSA) with UCNPs as a label. Using a specific anti-HSA antibody and a control anti-mouse antibody, various LFIA parameters were optimized. The immobilization of antibodies was done using acetate buffer with 1% methanol, glass membrane ST17 was used as a conjugate pad, and Tris buffer with 5% sucrose was used to stabilize the particles within the conjugate pad. The choice of a different nitrocellulose membrane had a relatively small effect on assay performance; the best results were achieved with membrane 120 HP Plus Thick. Our work has successfully demonstrated the potential of using UCNPs as sensitive labels in LFIA tests.

Keywords: photon-upconversion nanoparticle, UCNP, immunoassay, human serum albumin, HSA, diagnostic strip, LFIA

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220335>