

# IMUNOMAGNETICKÉ STANOVENIE S VYUŽITÍM FOTÓN-UPKONVERZNÝCH NANOČASTÍČ PRE DETEKCIU RAKOVINNÝCH BIOMARKEROV

DOROTA SKLENÁROVÁ,  
EKATERINA MAKHNEVA a ZDENĚK FARKA

Ústav biochémie, Prírodovedecká fakulta, Masarykova  
univerzita, 625 00 Brno, Česká republika  
sklenarova@mail.muni.cz

Kľúčové slová: fotón-upkonverzné nanočastice, UCNP,  
imunostanovenie, prostatický špecifický antigén, ELISA,  
ULISA, magnetické mikročastice

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20230266>

## Úvod

Karcinóm prostaty je najrozšírenejšia forma rakoviny v celosvetovej populácii mužov. Pre včasnú diagnózu počiatočného štádia karcinómu prostaty je kľúčová včasná detekcia prostatického špecifického antigénu (PSA), ktorý je najdôležitejším biomarkerom tohto ochorenia. Koncentrácia PSA v krvnom sére zdravých mužov dosahuje hodnoty do 2,5 ng ml<sup>-1</sup>; vyššie hodnoty sú považované za patologické<sup>1</sup>. Keďže zmena hodnôt PSA v sére indikujúca rekurenciu ochorenia môže nastať aj vo veľmi úzkom rozmedzí (0,1–0,2 ng ml<sup>-1</sup>), je nevyhnutné využívať extrémne citlivé analytické metódy<sup>2</sup>.

Enzýmové imunostanovenie (ELISA) je považované za zlatý štandard medzi diagnostickými metódami. Táto technika využíva mikrotitračné doštičky ako pevnú fázu a značky na báze enzýmov. Po reakcii s vhodným chromogénnym substrátom poskytujú tieto značky farebný signál, ktorého intenzita je úmerná koncentrácii analytu. Enzýmové imunostanovenia na mikrotitračných doštičkách však často nie sú dostatočne citlivé pre včasnú detekciu subklinických koncentrácií analytov. Pre zlepšenie parametrov je možné zaviesť vhodné alternatívy pre pevnú fázu a značenie<sup>1</sup>.

Magnetické mikročastice (MB) sú vhodnou alternatívou pre pevnú fázu, nakoľko ich väčší špecifický povrch umožňuje efektívnejšiu väzbu záchytovacej protilátky, rovnako ako prekoncentráciu analytu. Superparamagnetické vlastnosti MB vedú k jednoduchej magnetickej separácii vzniknutého imunokomplexu v roztoku<sup>1</sup>.

Ako vhodná alternatíva pre značenie v imunostanoveniach sa ukazuje byť využitie nanomateriálov, ako sú fotón-upkonverzné nanočastice (UCNP). Jedná sa o nanokryštály na báze anorganickej matrice (najčastejšie NaYF<sub>4</sub>) dopovanej lanthanoidovými iónmi. Vďaka svojej štruktúre sú schopné tzv. anti-Stokesovej luminiscencie, ktorá umožňuje detekciu bez interferencií optického poza-

dia. Pre využitie v imunostanoveniach je nutné povrch UCNP modifikovať a pripojiť k nim biorekogničný element. Biokonjugáty UCNP je možné použiť ako alternatívne značenie v upkonverznom imunostanovení (ULISA) a s ich pomocou dosiahnuť 10–100× citlivejšej detekcie než v prípade techniky ELISA (cit.<sup>3</sup>).

Cieľom našej práce bolo vyvinúť dosiaľ neexistujúce imunostanovenie využívajúce MB a UCNP pre detekciu PSA a výsledky porovnať s konvenčným ELISA a ULISA stanovením. V konečnej fáze bolo vyvinuté imunostanovenie s magnetickej separáciou, čo umožnilo prekoncentráciu analytu a ďalšie zlepšenie parametrov.

## Experimentálna časť

### Materiál

Hovädzie sérum a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidín (TMB) boli dodané firmou Merck/Sigma-Aldrich (USA). PSA (ab78528), monoklonálna anti-PSA protilátka (ab403) a streptavidínom modifikované HRP (SA-HRP) boli z firmy Abcam (UK). Biotinylovaná anti-PSA protilátka (BAF1344) bola zakúpená od firmy R&D Systems (USA). MB nesúce tosylóve skupiny (Dynabeads MyOne, priemer 1 µm) pochádzali z firmy Thermo Fischer Scientific (USA). Všetky ostatné chemikálie pochádzali z firmami Carl Roth (Nemecko), alebo Penta (Česká republika). Tlmiivé roztoky použité v tejto práci boli fosfátový pufer (PB; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4), a pufer pre priebeh imunostanovenia (AB; PB s prídavkom 10 % SuperBlock, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, 0,01 % Tween 20, 1 mM KF, 150 mM NaCl; pH 7,5). V ELISA experimentoch boli použité rovnaké pufrы, ale bez prídavku NaN<sub>3</sub>.

### Príprava biokonjugátov UCNP so streptavidínom

*Syntéza UCNP:* 250 mg zárodočných nanočastíc (NaYF<sub>4</sub> dopovaný 18 % Yb<sup>3+</sup> a 2 % Tm<sup>3+</sup>) bolo rozpustených v 5,5 ml kyseliny olejovej a 17 ml oktadek-1-énu a zahriatych v dusíkovej atmosfére na 300 °C. Rast nanočastíc bol iniciovaný vstrekaním prekursorov trifluoroktánu do disperzie.

*Príprava alkýn-PEG-Ner linkeru:* Zmes 30 mg neridronátu v 1M NaOH (128 µl) v 368 µl PB pufru a alkýn-PEG-NHS v 500 µl PB pufru bola inkubovaná cez noc pri 4 °C. Následne bola zmes dialyzovaná proti destilovanej vode (dH<sub>2</sub>O) pomocou Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 500–1000 Da, Carl Roth, Nemecko), lyofilizácia roztoku a uchovávanie pri 4 °C.

*Príprava alkýn-PEG-Ner-UCNP:* Zmiešanie 10 mg UCNP v cyklohexáne s 200 mM HCl v pomere 1:1 (v/v). Po sonikácii, odobraní hornej fázy, pridaní acetónu

a centrifugácii nasledovalo rozpustenie peletu v 500  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  a zmiešanie s pripraveným linkerom. Zmes bola inkubovaná cez noc pri 38 °C a konjugát bol dialyzovaný proti  $\text{dH}_2\text{O}$  pomocou dialyzačného zariadenia Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 100 kDa) a uchovávaný pri 4 °C.

**Click-konjugácia so streptavidínom:** Ku 10 mg konjugátu UCNP v 1,4 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  bolo pridaných 100  $\mu\text{l}$  Tris pufru (375 mM, pH 7,5) a 20  $\mu\text{l}$  vodného roztoku askorbátu sodného (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ ). Zmes bola prebublávaná argónom a nasledovalo pridanie 100  $\mu\text{l}$  azidom modifikovaného streptavidínu v PB puFRE (1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ). Click-reakcia bola zahájená pridaním 10  $\mu\text{l}$  vodného roztoku  $\text{CuSO}_4$  (6,25 mM) a po prebublání argónom bolo pridaných ďalších 10  $\mu\text{l}$ . Nakoniec prebehla dialýza proti dialyzačnému puFRE (50 mM Tris, 0,05 %  $\text{NaN}_3$ , 1 mM KF; pH 7,4).

## Výsledky a diskusia

### Porovnanie mikrotitračnej doštičky a MB pre ELISA stanovenie

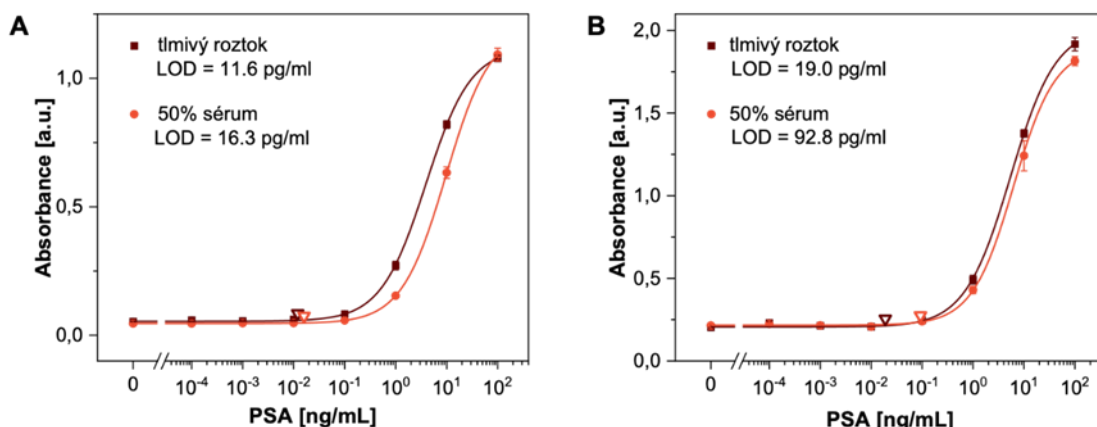
Nakoľko je ELISA najrozšírenejším formátom imunostanovení v klinickej analýze, bola táto technika vykonaná pre detekciu PSA v konvenčne používannej mikrotitračnej doštičke, rovnako ako s využitím MB ako pevnej fázy. ELISA na mikrotitračnej doštičke (obr. 1A) dosiahla limit detekcie (LOD) 11,6  $\text{pg ml}^{-1}$  v AB a 16,3  $\text{pg ml}^{-1}$  v 50% sére, s pracovným rozsahom ( $EC_{20}$ – $EC_{80}$ ) 0,95–15,9  $\text{ng ml}^{-1}$  pre AB, a 2,40–38,8  $\text{ng ml}^{-1}$  pre vzorky séra. V ďalšom kroku bola prevedená ELISA s využitím MB ako pevnej fázy (obr. 1B), ktorá dosiahla LOD 19,0  $\text{pg ml}^{-1}$  v AB, a 92,8  $\text{pg ml}^{-1}$  v sére. Pracovné rozmedzie bolo 1,29–22,6  $\text{ng ml}^{-1}$ , resp. 1,69–38,8  $\text{ng ml}^{-1}$ . Počas imunostanovenia na MB bolo nutné optimalizovať jeho priebeh, s cieľom dosiahnuť rovnomernú distribúciu MB na dne mikrotitračných doštičiek (pre účely premývania a odčítania signálu).

### Porovnanie mikrotitračnej doštičky a MB pre ULISA stanovenie

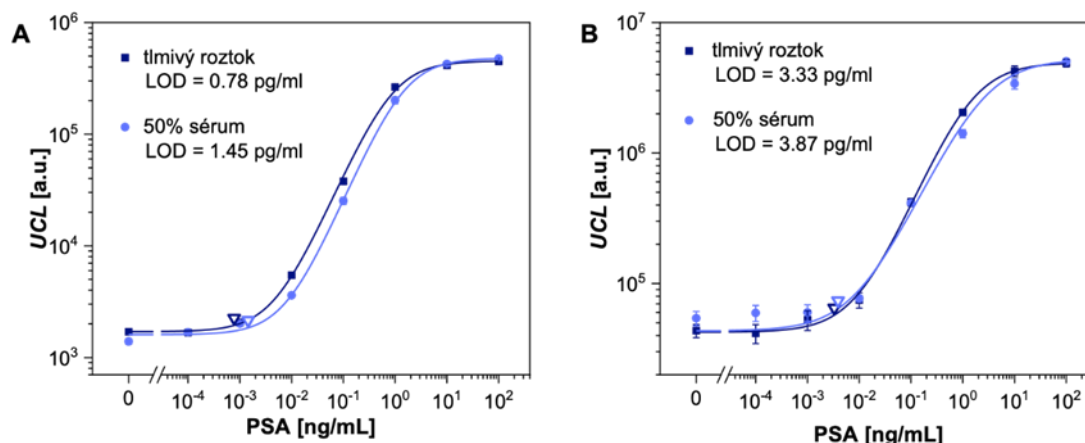
Imunostanovenia využívajúce UCNP ako značenie predstavujú alternatívne formáty imunostanovení s vyššou citlivosťou. ULISA stanovenie na mikrotitračnej doštičke (obr. 2A) dosiahlo LOD 0,78  $\text{pg ml}^{-1}$  v AB, a 1,45  $\text{pg ml}^{-1}$  v 50% sére, s pracovným rozmedzím 0,24–3,10  $\text{ng ml}^{-1}$  v AB a 0,42–5,10  $\text{ng ml}^{-1}$  v modelových reálnych vzorkách. Keďže MB-ULISA vyžadovala využitie magnetov pri premývaní, bolo nutné pred odčítaním signálu zaviesť resuspenziu MB v malom množstve AB puFRE. Tento experiment (obr. 2B) dosiahol LOD 3,33  $\text{pg ml}^{-1}$  v AB a 3,87  $\text{pg ml}^{-1}$  v 50% sére, s pracovnými rozmedziami 0,33–6,07  $\text{ng ml}^{-1}$ , resp. 0,50–13,0  $\text{ng ml}^{-1}$ . ULISA s využitím MB teda vykazovala LOD porovnateľné s ULISA stanovením na mikrotitračnej doštičke, a širšie pracovné rozmedzia. Tieto experimenty demonštrovali signifikantné zlepšenie citlivosti oproti konvenčným ELISA stanoveniam.

### ULISA stanovenie s magnetickou prekoncentráciou

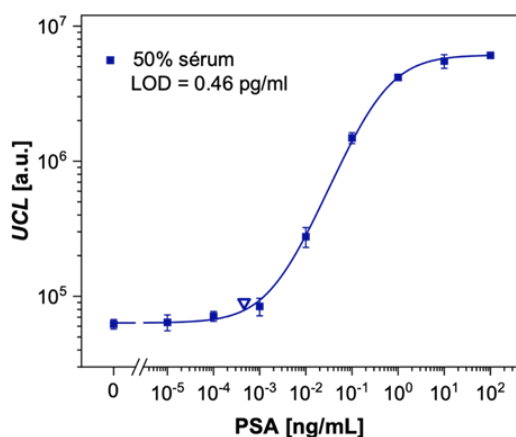
Pre ďalšie zlepšenie citlivosti detekcie PSA bolo prevedené ULISA stanovenie s dodatočnou prekoncentráciou analytu s využitím MB (obr. 3). Tento experiment bol prevedený v reálnych vzorkách 50% séra, ktoré boli prekoncentrované z objemu 4 ml na objem 0,5 ml (prekoncentračný faktor 8). Dosiahnuté pracovné rozmedzie bolo 0,08–2,06  $\text{ng ml}^{-1}$ , s LOD 0,46  $\text{pg ml}^{-1}$ . Použitie zvýšeného objemu roztoku PSA viedlo k efektívnejšiemu naviazaniu analytu na povrch magnetickej mikročastice konjugovanej s protilátkou. Výsledné 8,4-násobné zlepšenie LOD korešpondovalo s prekoncentračným faktorom a demonštrovalo potenciál tejto metódy.



Obr. 1. Výsledky ELISA stanovení s využitím mikrotitračnej doštičky (A) a MB (B) ako pevnej fázy



Obr. 2. Výsledky ULISA stanovení s využitím mikrotitračné doštičky (A) a MB (B) ako pevnej fázy



Obr. 3. Výsledky ULISA stanovenia s magnetickou prekoncentráciou

## Záver

Využitie magnetických mikročastíc ako pevnej fázy a UCNP ako alternatívneho značenia bolo študované pre zvýšenie citlivosti imunostanovení pre detekciu PSA. Boli vyvinuté a optimalizované ELISA a ULISA stanovenia s využitím magnetických mikročastíc a ich parametre boli porovnané s imunostanoveniami využívajúcimi konvenčné mikrotitračné doštičky. Využitie UCNP v imunostanoveniach viedlo k významnému zlepšeniu LOD, a preto boli tieto stanovenia ďalej vyvíjané a optimalizované pre prevedenie ULISA stanovení s magnetickou prekoncentráciou, ktorá viedla k ďalšiemu 8,4-násobnému zlepšeniu LOD, čož korešpondovalo s teoretickým prekon-

centračným faktorom. Bol tak demonštrovaný potenciál využitia MB a UCNP pre signifikantne zvýšenú citlivosť imunostanovení a detekciu nízkych koncentrácií PSA, ako aj iných rakovinových biomarkerov.

## LITERATÚRA

1. Makhneva E., Sklenářová D., Brandmeier J. C., Hlaváček A., Gorris H. H., Skládal P., Farka Z.: *Anal. Chem.* 94, 16376 (2022).
2. Farka Z., Mickert M. J., Hlaváček A., Skládal P., Gorris H. H.: *Anal. Chem.* 89, 11825 (2017).
3. 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 M. C., Gorris H. H.: *Biosens. Bioelectron.* 170, 112683 (2020).

**D. Sklenářová, E. Makhneva, and Z. Farka**  
(Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic): **Immunomagnetic Assay Using Photon-Upconversion Nanoparticles for the Detection of Cancer Biomarkers**

Prostatic carcinoma is the most frequently diagnosed type of cancer within the male population worldwide. The most important prostate cancer biomarker is the prostate-specific antigen (PSA). Changes in PSA concentration may occur in very narrow ranges, making ultrasensitive analytical methods necessary. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered the gold standard of analytical methods. It utilizes microtiter plates as solid phase and enzyme-based labels. However, ELISAs are often not sensitive enough for early-stage detection of subclinical levels of PSA. To enhance the sensitivity, it is

possible to introduce suitable alternatives for both the solid phase and the label.

Our work focuses on the use of magnetic microparticles (MBs) and photon-upconversion nanoparticles (UCNPs) as alternatives for solid phase and the label, respectively. The superparamagnetic properties and higher specific surface of MBs allows for analyte preconcentration and simple magnetic separation of the immunocomplex. UCNPs, on the other hand, are nanocrystals exhibiting anti-Stokes luminescence (converting light in the NIR region to visible light). After surface modification, it is possible to utilize UCNPs as labels in the upconversion-linked immunosorbent assay (ULISA), significantly enhancing the sensitivity. We have developed and optimized ELISA and ULISA assays for the detection of PSA and compared their parameters with the equivalent assays utilizing MBs as solid phase. Moreover, we have developed a novel ULISA method with an additional magnetic preconcentration step to further enhance sensitivity, providing a limit of detection of  $0.46 \text{ pg mL}^{-1}$ .

**Keywords:** photon-upconversion nanoparticles, UCNPs, immunoassay, prostate-specific antigen, ELISA, ULISA, magnetic microparticles



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.