

УДК 571.27; 577.322.2; 57.083.3

МУЛЬТИАНАЛИЗ ОНКОМАРКЕРОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ПОВЕРХНОСТИ ПОРИСТЫХ И ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НОСИТЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ

Г.В. Преснова¹, Д.Е. Преснов^{2,3}, В.А. Крупенин³, М.М. Уляшова¹, А.М. Егоров¹, М.Ю. Рубцова^{1*}

(¹ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ² Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ³ Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; *e-mail: mrubtsova@gmail.com)

Разработан метод одновременного определения тиреоглобулина и тиреотропного гормона на микрочипах с использованием наночастиц золота в качестве метки антител. Принцип определения основан на сэндвич-иммуноанализе с использованием пары антител, одновременно связывающихся с определяемым соединением. Проведен скрининг специфических моноклональных антител и выбраны пары антител, обеспечивающие лучшую чувствительность и специфичность определения гормонов, а также лучшее соотношение сигнал/фон. В качестве носителей использованы нитроцеллюлоза и кремний. Аналитическим сигналом служила интенсивность окрашивания зон микрочипа на мембранном носителе и плотность наночастиц на кремнии. Предел обнаружения тиреоглобулина и тиреотропного гормона составил соответственно 0,25 нг/мл и 0,016 мкМЕ/мл на мембранном носителе, 0,1 нг/мл и 0,013 мкМЕ/мл на кремнии. Разработанный метод в дальнейшем может быть использован при создании наносенсорных устройств для экспресс-диагностики патологий щитовидной железы.

Ключевые слова: микрочипы, сэндвич-иммуноанализ, наночастицы золота, онкомаркеры, гормоны щитовидной железы.

Рак щитовидной железы составляет в среднем 1–1,5% от всех злокачественных новообразований, однако в последние годы отмечается тенденция к увеличению частоты данного заболевания, особенно в зонах мультифакторного загрязнения окружающей среды [1]. В большинстве случаев щитовидная железа поражается дифференцированными формами опухолей, при своевременном лечении которых наблюдаются удовлетворительные результаты.

Основным молекулярным маркером высокодифференцированных злокачественных образований щитовидной железы является тиреоглобулин (ТГ). По своей функции он представляет собой прогормон щитовидной железы, необходимый для дальнейшего синтеза тироксина и трийодтиронина. Его синтез щитовидной железой резко активируется при развитии опухолей. Выявление даже незначительного изменения уровня ТГ в сыворотке крови обеспечивает раннее диагностирование рецидивов и метастазов. При оценке ТГ всегда

необходимо учитывать концентрацию тиреотропного гормона (ТТГ). Он образуется в гипофизе и участвует в регуляции основных тиреоидных гормонов по принципу отрицательной обратной связи, т.е. ТТГ стимулирует образование тиреоидных гормонов, подавляющих его синтез. Определение концентрации ТТГ в сыворотке крови необходимо для оценки нормального функционирования щитовидной железы, а изменение уровня ТГ позволяет оценить динамику лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы после тиреоидэктомии [2].

Очевидно, что разработка высокоспецифичных и чувствительных методов одновременного количественного определения гормонов ТГ и ТТГ как молекулярных маркеров онкопатологии щитовидной железы – одна из актуальных задач, стоящих перед исследователями [1, 3]. В последнее время в целях лабораторной диагностики мультифакторных заболеваний, в том числе онкологических, активно развиваются методы мультианализа. Эти

методы позволяют одновременно определять несколько диагностически значимых маркеров, что существенно уменьшает время анализа, его стоимость и способствует улучшению качества диагностики. В литературе описаны мультиплексные тесты для определения сразу нескольких маркеров щитовидной железы [4–6]. Все эти методы основаны на использовании специфических антител к определяемым соединениям, в качестве метки обычно используют флуоресцентные или ферментативные системы, а также систему стрептавидин–биотин.

Цель данной работы заключалась в разработке метода одновременного определения ТГ и ТТГ на микрочипах с использованием наночастиц золота в качестве метки антител. Наночастицы золота широко применяются в качестве маркеров для определения локализации опухолевых клеток непосредственно в живых системах, а также в качестве меток в лабораторных исследованиях для определения низких концентраций биологически значимых соединений, в том числе для ранней диагностики онкологических заболеваний [7, 8]. Уникальные оптические свойства золотых наночастиц позволяют проводить визуализацию образовавшихся иммунных комплексов без использования дополнительных стадий определения активности метки. В качестве носителей для микрочипов использован пористый мембранный носитель и кремний. Выбор носителей обусловлен их свойствами: пористые мембранные носители обладают сильноразвитой поверхностью для эффективной иммобилизации антител и характеризуются простотой использования. Кремний используют в современных наноразмерных сенсорных устройствах [9, 10], перспективных для создания портативных приборов, позволяющих проводить экспресс-диагностику.

Экспериментальная часть

В работе применяли реагенты компаний «Sigma», «Fluka» и «Химмед»; антигены (ТТГ, ТГ) и антивидовые антитела козы против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена, (НВО «Иммунотех», Россия), моноклональные антитела к ТТГ и ТГ («Биалекса» и НВО «Иммунотех», Россия), пористые носители из нитроцеллюлозы Protran BA 85 0,45 μm («Whatman», Германия), 96-луночные планшеты («Nunc», Германия).

В настоящем исследовании применяли следующие буферные растворы: 0,01 М К-фосфатный, pH 7,0 (ФБ); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, pH 7,4 (ФБС); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl,

0,1% твин-20, pH 7,4 (ФБСТ); 0,05 М карбонатный буфер, pH 9,5 (КБ).

Наночастицы золота со средним диаметром 16 нм получали по методу Френса, который основан на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия [11]. Размеры наночастиц золота были охарактеризованы спектрофотометрически ($\lambda_{\text{макс.}} = 518 \text{ нм}$) и подтверждены методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Получение конъюгата моноклональных антител с наночастицами золота. С использованием 2-меркаптоэтиламина получали фрагменты моноклональных антител с доступными тиоловыми группами, представляющие собой одну тяжелую и одну легкую цепь иммуноглобулинов [12]. Фрагменты антител в 0,01 М Na-фосфатном буфере, содержащем 5 мМ ЭДТА, инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре с коллоидным раствором наночастиц золота и центрифугировали (25 мин, 11 000 об/мин, 4 °С). Супернатант удаляли, осадок конъюгата антител с наночастицами золота суспендировали в 10 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,2).

Изготовление микрочипов. Мембранные носители предварительно модифицировали карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом, как описано в [13]. Кремниевые пластины предварительно очищали кислородной плазмой в установке реактивного ионного травления «RDE-300» («Alcatel», Франция) в течение 30 мин. Затем поверхность кремния химически модифицировали аминопропилтриметоксисиланом и 1,4-фенилендиизотиоцианатом, как описано ранее [14]. Растворы антител (100 мкмоль/мкл) наносили (в двух повторах) на поверхность носителей роботом «XactII Microarray System» («LabNEXT», США), использовали иглы с диаметром внутренней щели 500 мкм.

Проведение иммунохимического анализа гормонов ТГ и ТТГ. Стандартные растворы гормонов готовили на нулевой сыворотке теленка. Смесь растворов гормонов и конъюгата антител с наночастицами золота в ФБСТ (фиксированная концентрация) инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем отмывали ФБСТ три раза по 10 мин. В качестве отрицательного контроля использовали результаты, полученные для нулевой сыворотки, не содержащей ТТГ и ТГ.

Детекция результатов анализа. На мембранных микрочипах после инкубации и отмывки проводили в течение 5 мин реакцию увеличения размера наночастиц, используя раствор золотохлористоводородной кислоты и гидросиламина.

Затем микрочипы сканировали на приборе «Epson Perfection V750 pro» при разрешении 4800 dpi, для обработки изображения использовали программу Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0).

На кремниевых микрочипах регистрировали количество наночастиц золота методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в микроскопе «Supra-40» («Carl Zeiss», Германия) со встроенным в колонну микроскопа детектором вторичных электронов «InLens». Ускоряющее напряжение и ток луча подбирали таким образом, чтобы наночастицы были видны с наилучшим разрешением и контрастом. В качестве оптимального выбрали разрешение 75 000 КХ, что соответствует площади кадра 6,8 мкм². Для подсчета числа наночастиц и их плотности на единицу поверхности использовали программное обеспечение Gwyddion (Czech Metrology Institute, Чехия). При обработке результатов полагали, что число образовавшихся иммунных комплексов соответствует числу наночастиц золота за вычетом числа наночастиц, связавшихся неспецифично на контрольной зоне такой же площади.

Определение равновесной константы аффинности моноклональных антител проводили методом, предложенным в [15]. Антиген сорбировали в лунках 96-луночных планшетов из растворов концентрацией 0,5 и 1,0 мкг/мл в КБ, затем выдерживали в течение ночи при +4 °С. После трехкратной отмывки растворами ФБС и ФБСТ анализируемые антитела титровали от концентрации 100 нМ с шагом 2, затем инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Полученные иммунные комплексы выявляли антивидовыми антителами козы против мыши, мечеными пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали ТМБ. Через 10–15 мин реакцию останавливали добавлением в лунки планшета 0,2 М раствора H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Строили графики зависимости оптического поглощения от концентрации моноклональных антител. Константу аффинности определяли по формуле:

$$K_{\text{афф.}} = 1/2(2[AT'] - [AT]) \pm 3 \cdot SD,$$

где [AT'] – концентрация антител, соответствующая 50%-му связыванию при внесении в лунку планшета ТГ или ТТГ в концентрации 0,5 мкг/мл; [AT] – концентрация антител, соответствующая 50%-му связыванию при внесении в лунку антигена в концентрации 1 мкг/мл; SD – стандартное отклонение.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «UV-1602» («Shimadzu», Япония) и спектрофотометре для 96-лу-

ночных планшетов «Anthos 2020» («Anthos», Австрия).

Результаты и обсуждение

Для определения гормонов щитовидной железы ТГ и ТТГ на микрочипах использовали методу сэндвич-иммуноанализа. Моноклональные антитела одного типа были иммобилизованы на поверхности носителя. Для выявления иммунных комплексов на поверхности использовали меченые антитела второго клона. В качестве метки применяли наночастицы золота размером 16 нм. Для обеспечения максимальной чувствительности количественного определения исследуемых антигенов подбирали пары моноклональных антител, специфичных к неперекрывающимся антигенным детерминантам и обладающих максимальной аффинностью.

Методом сэндвич-иммуноферментного анализа был проведен скрининг моноклональных антител и изучены все их возможные комбинации, в которых один тип антител был иммобилизован, а антитела второго клона были использованы для получения конъюгатов, меченных пероксидазой хрена. Для ТТГ были исследованы шесть клонов моноклональных антител к разным антигенным детерминантам: два клона к целой молекуле ТТГ (С₁ и С₂), три клона к β-субъединице (В₁, В₂, В₃) и один клон к α-субъединице (А₁). Антитела А₁ были использованы только в составе конъюгата, так как α-субъединица неспецифична для ТТГ. Для ТГ были исследованы четыре клона моноклональных антител (I₁, I₂, I₃, I₄). Антитела клона I₄ были использованы только в составе конъюгата. Полученные результаты представлены на рис. 1.

При определении ТТГ наиболее высокая интенсивность ферментативной активности и, соответственно, максимальная концентрация сэндвич-иммунных комплексов наблюдалась для пары антител С₁ и С₂, а также для сочетаний этих антител с конъюгатом моноклональных антител А₁. Несмотря на то, что оба клона (С₁ и С₂) получены к целой молекуле ТТГ, их антигенные детерминанты не перекрываются и сэндвич-комплексы антител образуются эффективно. При использовании моноклональных антител В₃ с конъюгатами антител С₁ и А₁, специфичных к разным субъединицам ТТГ, интенсивность ферментативной реакции была низкой, а в случае А₁ – практически неотличимой от фонового окрашивания. При использовании антител клона В₂ в парах с конъюгатами на основе всех других типов антител было образовано очень мало комплексов, поэтому в дальнейшем их не применяли.

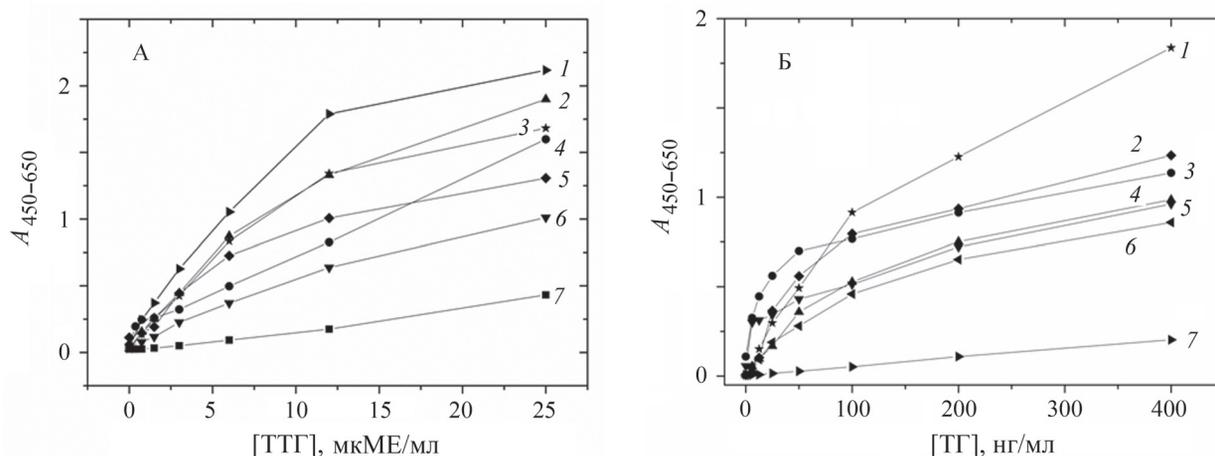


Рис. 1. Зависимость оптической плотности продукта ферментативной реакции от концентрации антигена ТТГ (А) и ТГ (Б). Имобилизованные антитела / антитела в составе конъюгата с пероксидазой хрена: (А) 1 – С2 / С1, 2 – С1 / А1, 3 – С2 / А1, 4 – В1 / С2, 5 – В1 / С1, 6 – В3 / С1, 7 – В3 / А1; (Б) 1 – I1 / I2, 2 – I2 / I1, 3 – I3 / I1, 4 – I3 / I2, 5 – I3 / I4, 6 – I1 / I4, 7 – I2 / I4

При определении ТГ наиболее высокая интенсивность ферментативной активности и, соответственно, максимальная концентрация сэндвич-комплексов наблюдались для пары антител I₁ и I₂. Незначительно более низкий сигнал наблюдался для антител I₂ и I₃ в сочетании с конъюгатом на основе моноклональных антител I₁.

Известно, что чувствительность сэндвич-иммуноанализа зависит от нескольких параметров, основным из которых считается равновесная константа образования комплекса антиген–антитело (константа аффинности). Мы определили значения констант аффинности моноклональных антител, которые показали хорошую эффективность выявления изучаемых антигенов. Для определения констант аффинности использовали метод твердофазного иммуноанализа [15]. Рассчитанные значения констант аффинности для антител, специфичных к ТТГ и ТГ, приведены в табл. 1. На основании

полученных значений в качестве первых антител для выявления гормонов могут быть использованы антитела клонов В₁, С₁, С₂ и I₁.

Далее проводили оптимизацию метода сэндвич-анализа для определения гормонов на микрочипах с использованием наночастиц золота в качестве метки. Особенность применения наночастиц золота на непрозрачных мембранных носителях белого цвета заключается в возможности либо визуальной детекции образовавшихся сэндвич-комплексов по окрашиванию зоны микрочипа, либо количественного определения интенсивности окрашивания с помощью оптических сканеров. Для микрочипов на основе полупроводниковых носителей, в частности кремния, возможно использование СЭМ для подсчета наночастиц-меток, что было показано нами ранее [16].

Поскольку размеры наночастиц-меток существенно превышают размеры молекул иммуногло-

Значения констант аффинности моноклональных антител к ТТГ и ТГ

Название моноклональных антител	Специфичность моноклональных антител	$K_{\text{афф.}}$, нМ
В ₁	ТТГ	4,1±0,4
С ₁	ТТГ	3,7±0,7
С ₂	ТТГ	3,2±0,8
В ₃	ТТГ	0,7±0,1
I ₁	ТГ	3,3±0,6
I ₂	ТГ	0,7±0,3
I ₃	ТГ	0,1±0,5

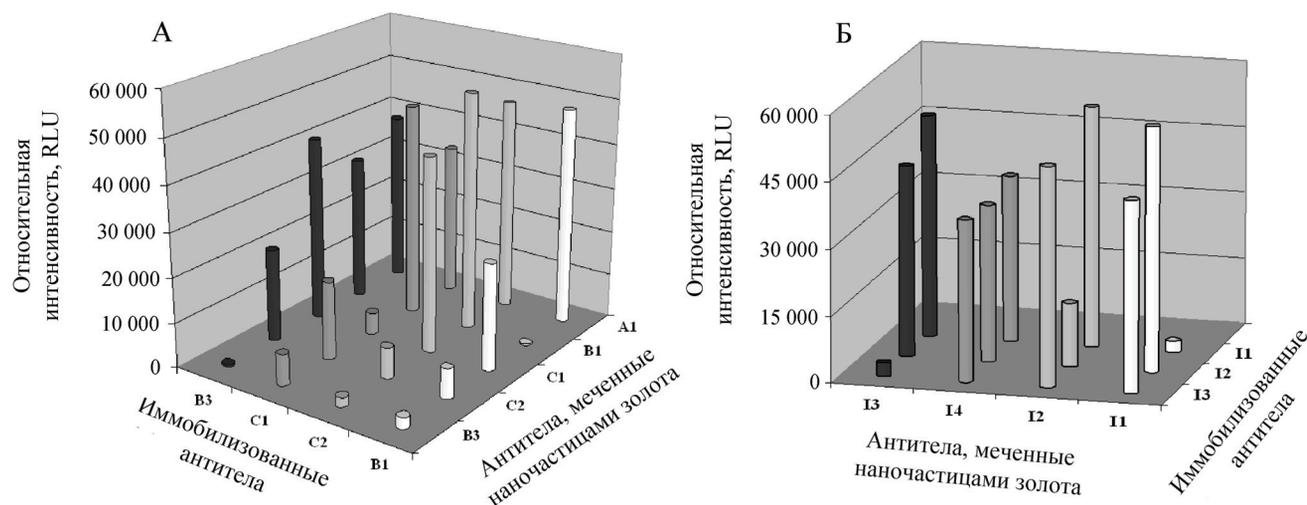


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности окрашивания зон микрочипов из пористого мембранного носителя от типа антител при определении ТТГ (42 мкг/мл) (А) и ТГ (200 нг/мл) (Б). В качестве метки использованы наночастицы золота

булинов, растет вероятность стерических затруднений при выявлении иммунных комплексов. Эти ограничения могут усиливаться, если антигенные детерминанты для антител разных клонов близко расположены. Поэтому для каждого гормона были исследованы несколько пар антител с разной специфичностью и получены несколько конъюгатов антител с наночастицами золота. Для снижения диффузионных и стерических ограничений использовали наночастицы золота диаметром 16 нм. Полученные конъюгаты были окрашены в розовый цвет. Вследствие этого образовавшиеся на поверхности микрочипов иммунные комплексы имели низкоконтрастную слабо-розовую окраску. Поэтому для усиления интенсивности аналитических сигналов после стадии иммунологического связывания и отмывки проводили дополнительную стадию увеличения размера наночастиц-меток на носителе с использованием реакции восстановления золотохлористоводородной кислоты в присутствии гидроксилamina. В этом случае получали зоны микрочипа, окрашенные в темный, более контрастный цвет. На рис. 2 представлены результаты сравнительного изучения разных пар антител для определения ТТГ и ТГ на микрочипах из нитроцеллюлозы. Для определения ТТГ (рис. 2, А) оптимальным представляется иммобилизация антител клона C_2 и использование антител клона B_1 в составе конъюгата. При использовании пары антител C_1 и C_2 , вероятно, возникали стерические затруднения из-за размера наночастиц, конъюгат на основе антител

C_1 характеризовался высоким уровнем фонового сигнала. Для ТГ образование иммунных комплексов было наиболее эффективным при использовании в разных сочетаниях пары антител I_1 и I_2 , как в качестве иммобилизованных антител, так и в составе конъюгатов с наночастицами золота (рис. 2, Б), а также при использовании иммобилизованных антител I_3 в сочетании с конъюгатом на основе антител I_1 , что совпадает с данными иммуноферментного анализа.

Аналогичные результаты были получены для кремниевых носителей. На рис. 3 приведено изображение фрагмента микрочипа, включающего границу нанесения моноклональных антител C_2 . Для выявления иммунных комплексов ТТГ использовали конъюгаты антител C_1 и B_1 с наночастицами золота. Визуализацию золотых наночастиц проводили методом СЭМ, число комплексов рассчитывали с помощью программного обеспечения Gwyddion. Для конъюгата на основе антител C_1 , по сравнению с конъюгатом на основе антител B_1 , характерен высокий уровень фонового сигнала: на изображении видно, что число комплексов, образовавшихся вне зоны нанесения антител, выше при использовании конъюгата антител C_1 , чем при использовании конъюгата антител B_1 .

На основании анализа полученных результатов для дальнейшей работы были выбраны пары антител. Для определения ТТГ мы выбрали моноклональные антитела C_2 для иммобилизации на носителе и меченые антитела B_1 в составе конъюгата. Для определения ТГ выбраны моноклональ-

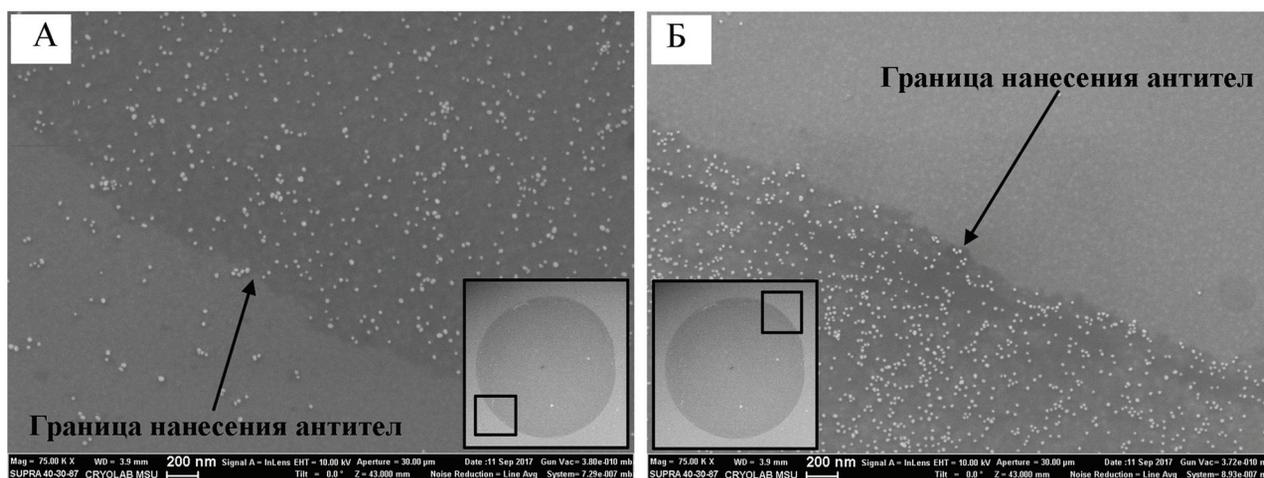


Рис. 3. Изображение фрагмента кремниевого микрочипа после выявления иммунных комплексов ТТГ конъюгатами антител C_1 (А) и B_1 (Б), меченных наночастицами золота. На микрочипе иммобилизованы моноклональные антитела C_2

ные антитела I_1 для иммобилизации на носителе и меченые антитела I_2 . Данные пары антител были использованы для разработки метода одновременного определения ТТГ и ТГ на микрочипах из нитроцеллюлозы и кремния. Для этого на один микрочип наносили антитела, специфичные к ТТГ и ТГ, в виде отдельных зон. Каждый образец антител наносился в двух повторах. На рис. 4 представлены изображения микрочипов после проведения анализа ТТГ и ТГ отдельно и совместно в одной пробе. Показано, что выбранные антитела, будучи высокоспецифичными, обеспечивают высокую селективность определения гормонов ТТГ и ТГ как отдельно, так и в смеси.

На рис. 5 приведены градуировочные кривые для одновременного определения гормонов щитовидной железы ТТГ и ТГ на микрочипах из пористых мембранных носителей и кремния методом сэндвич-иммуноанализа с наночастицами золота в качестве метки. Аналитическим сигналом служит интенсивность окрашивания зон микрочипа на мембранном носителе и число наночастиц на

единицу площади поверхности (плотность наночастиц) на кремнии. Предел обнаружения ТТГ составил 0,016 мкМЕ/мл на мембранном носителе и 0,013 мкМЕ/мл на кремнии с детекцией методом СЭМ. Предел обнаружения ТГ составил 0,25 нг/мл на мембранном носителе и 0,1 нг/мл на кремнии. Из приведенных данных видно, что предел обнаружения для разработанных методов при использовании наночастиц золота существенно ниже, чем для стандартного метода иммуноферментного анализа (0,05 мкМЕ/мл и 1,0 нг/мл). Другим преимуществом разработанного метода являются низкие значения неспецифического связывания конъюгатов антител с поверхностью носителей. Это способствует существенному увеличению отношения сигнал/фон, что позволяет снизить предел обнаружения гормонов. Одновременное определение ТТГ и ТГ как молекулярных маркеров может быть использовано для контроля эффективности лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы после тиреоидэктомии.

Высокая чувствительность разработанного метода совместного определения гормонов на микрочипах из кремния позволит использовать его при создании наносенсорных устройств для экспресс-диагностики. Перспективным подходом может стать также увеличение размера наночастиц после проведения иммунологического распознавания антигена, что позволит существенно увеличить чувствительность анализа на мембранном носителе. В дальнейшем это можно использовать для повышения чувствительности методов биоспецифического анализа на мембранных носителях.

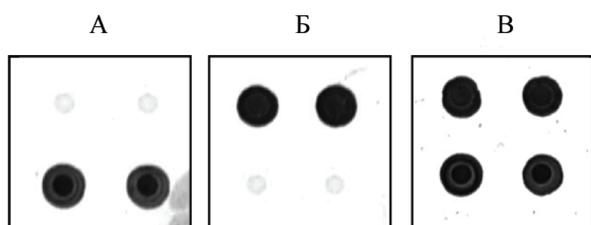


Рис. 4. Изображения микрочипов из пористого мембранного носителя после проведения сэндвич-иммуноанализа определения: А – ТГ (200 нг/мл), Б – ТТГ (42 мкМЕ/мл), В – совместного определения ТГ и ТТГ

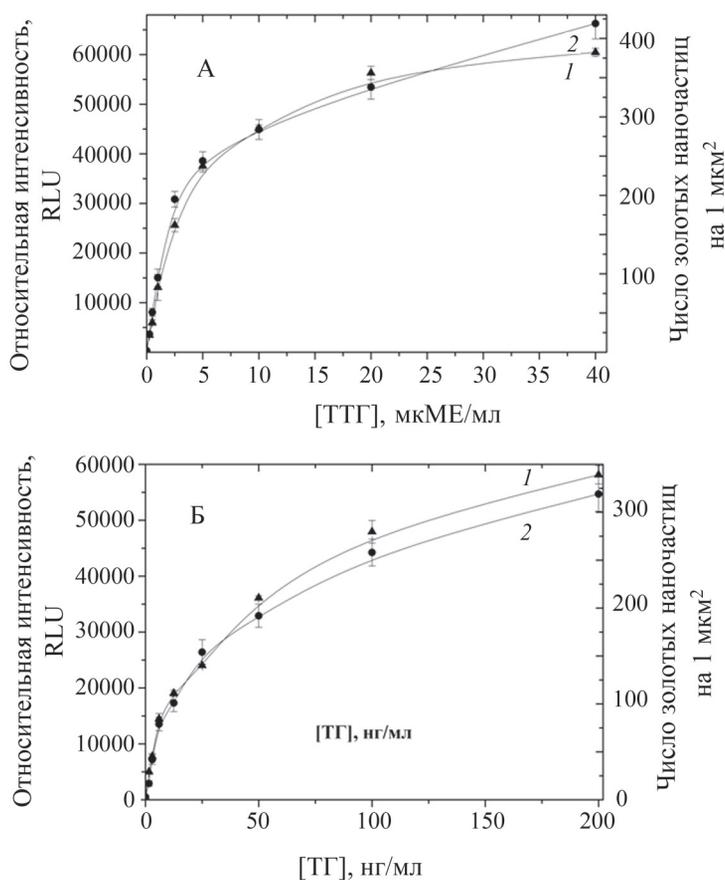


Рис. 5. Градуировочные кривые одновременного определения ТТГ (А) и ТГ (Б) с использованием наночастиц золота в качестве метки на поверхности пористого носителя из нитроцеллюлозы (1) и кремния (2)

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-29-03266). Использовалось оборудование Учебно-методического центра литографии и микроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Azmat U., Porter K., Senter L., Ringel M.D., Nabhan F. // *Thyroid*. 2017. Vol. 27. P. 74.
2. Spencer C., LoPresti J., Fatemi S. // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2014. Vol. 21. P. 394.
3. Jain B, Kumarasamy J., Gholve C., Kulkarni S., Rajan M.G.R. // *Ind J Clin Biochem*. 2017. Vol. 32. P. 193.
4. Бекман Н.И., Ларичева С.Ю., Быченко Т.А., Помелова В.Г., Осин Н.С. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015. Vol. 60. P. 23.
5. Hoogendoorn E.H., Hermus Ad.R., de Vegt F., Ross H.A. // *Clin. Chem*. 2006. Vol. 52. P. 104.
6. Jensen E., Petersen P.H., Blaabjerg O., Hegedus L. et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007. Vol. 45. P. 1058.
7. Huang X., O'Connor R., Kwizera E.A. // *Nanotheranostics*. 2017. Vol. 1. P. 80.
8. Li X., Chen B., He M., Hu B. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. Vol. 90. P. 343.
9. Malsagova K.A., Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Kozlov A.F., Archakov A.I., Popov V.P., Fomin B.I., Latyshev A.V. // *Analytical Methods*. 2015. Vol. 7. P. 8078.
10. Presnova G., Presnov D., Krupenin V., Grigorenko V., Trifonov A., Andreeva I., Ignatenko O., Egorov A., Rubtsova M. // *Biosens. Bioelectron.* 2017. Vol. 88. P. 283.
11. Frens G. // *Nature Phys. Sci.* 1973. Vol. 241. P. 20.
12. Karyakin A.A., Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. // *Anal. Chem*. 2000. Vol. 72. P. 805.
13. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. Vol. 26. P. 1252.
14. Преснова Г.В., Преснов Д.Е., Григоренко В.Г., Егоров А.М., Рубцова М.Ю. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2016. Vol. 57. P. 82.
15. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // *J. Immunol. Methods*. 1987. Vol. 100. P. 173.
16. Presnova G. V., Rubtsova, M.Yu., Presnov D.E., Grigorenko V.G., Yaminsky I.V., Egorov A.M. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2014. Vol. 8. P. 164.

MULTIANALYSIS OF THYROID CANCER MARKERS ON POROUS MEMBRANE SURFACE AND SEMICONDUCTOR SUPPORTS USING GOLD NANOPARTICLES AS LABEL

G.V. Presnova¹, D.E. Presnov^{2,3}, V.A. Krupenin³, M.M. Ulyashova¹, A.M. Egorov¹, M.Yu. Rubtsova^{1*}

(¹Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; ²Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University; ³Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: mrubtsova@gmail.com)

We present a method for simultaneous determination of thyroglobulin and thyroid-stimulating hormone on microchips using gold nanoparticles for antibodies labeling. Nitrocellulose and silicon were used as supports for microchips. The determination principle is based on the sandwich-immunoassay using a pair of antibodies that simultaneously bind to the analyte. Specific monoclonal antibodies providing better sensitivity and specificity for determination of hormones, as well as a better signal-to-background ratio were selected. The analytical signal was the intensity of microchip spots staining on the membrane carrier and the density of nanoparticles on silicon. The detection limit for thyroglobulin and thyroid-stimulating hormone was found of 0.25 ng/ml and 0.016 μ IU/ml on a membrane support, and of 0.1 ng/ml and 0.013 μ IU/ml on silicon, respectively. The method can be further used for developing nanosensor devices for express diagnostics of thyroid pathologies.

Key words: microchips, sandwich immunoassay, gold nanoparticles, oncomarkers, thyroid hormones.

Сведения об авторах: Преснова Галина Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (gpresnova@gmail.com); Преснов Денис Евгеньевич – ст. науч. сотр. отдела микроэлектроники Научно-исследовательского института ядерной физики им. Д.В. Скобельцына МГУ, канд. физ.-матем. наук (denis.presnov@physics.msu.ru); Крупенин Владимир Александрович – ст. науч. сотр. лаборатории Криоэлектроника кафедры полупроводников физического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (krupenin@physics.msu.ru); Уляшова Мария Морисовна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mmulyashova@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, акад. РАН (alex.m.egorov@gmail.com); Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com).