

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

И. В. Коктыш¹, Я. И. Мельникова¹, О. С. Кулакович^{2*}, А. А. Романенко²,
С. В. Ващенко³, А. О. Муравицкая², С. В. Гапоненко², С. А. Маскевич¹

УДК 544.77;620.3;535.372/343.2

¹Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, 220070, Беларусь

²Институт физики НАН Беларуси,
220072, Минск, Беларусь; e-mail: o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by

³Белорусский государственный университет, 220030, Минск, Беларусь

(Поступила 12 мая 2020)

Рассмотрены возможности применения эффекта плазмонного усиления флуоресценции моноклональных антител, меченных изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ), к простат-специфическому антигену (ПСА) для повышения чувствительности иммунофлуоресцентного анализа. Впервые для определения ПСА применена иммунохимическая тест-система двуцентрового связывания с использованием пары неконкурирующих моноклональных антител в сочетании с плазмонными наночастицами серебра и показано его преимущество перед стандартной методикой иммунофлуоресцентного анализа ПСА. Интенсивность регистрируемого флуоресцентного сигнала в присутствии наночастиц серебра повышается в 2.3—3.2 раза по сравнению с сигналом, полученным при иммобилизации тест-системы на интактной поверхности полистирольного планшета; отношение сигнал/шум повышается до двух раз. Помимо эффекта плазмонного усиления флуоресценции показано влияние промежуточного слоя полиэлектролита, увеличивающего сорбционную емкость первичных антител к ПСА, на интенсивность детектируемого флуоресцентного сигнала. Повышение коэффициента плазмонного усиления флуоресценции с ростом концентрации меченых антител к ПСА свидетельствует о подавлении металлическими частицами процессов самотушения флуоресцентных меток.

Ключевые слова: простат-специфический антиген, плазмон-усиленная флуоресценция, наночастицы серебра, полиэлектролит, иммунофлуоресцентный анализ.

We consider the possibilities of applying the plasmon-enhanced fluorescence of monoclonal antibodies labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) to the prostate-specific antigen (PSA) for increasing the immunofluorescence analysis sensitivity. For the first time, for determining the PSA concentration we applied an immunochemical test system of two-center binding using a pair of non-competing monoclonal antibodies in combination with silver plasmon nanoparticles. The advantages over the standard PSA immunofluorescence assay are shown, namely: the intensity of the recorded fluorescent signal is increased by 2.3—3.2 times in the presence of silver nanoparticles in comparison with the signal of the test system on the intact surface of a polystyrene plate; the signal-to-noise ratio is increased by up to 2 times. In addition to the plasmon-enhanced fluorescence, the effect of an intermediate polyelectrolyte layer on the increasing of the sorption capacity of primary PSA antibodies is shown, which in turn influences the fluorescence signal in-

HIGHLY SENSITIVE IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN USING SILVER NANOPARTICLES

I. V. Koktysh¹, Ya. I. Melnikova¹, O. S. Kulakovich^{2*}, A. A. Ramanenka², S. V. Vaschenko³,
A. O. Muravitskaya², S. V. Gaponenko², S. A. Maskevich¹ (¹International Sakharov Environmental In-
stitute of Belarusian State University, Minsk, 220070, Belarus; ²B. I. Stepanov Institute of Physics of the Na-
tional Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by;
³Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus)

tensity. A growth of the plasmon fluorescence enhancement factor with increasing the concentration of the labeled antibodies indicates the suppression of the self-quenching of the fluorescent labels by metal nanoparticles.

Keywords: prostate-specific antigen, plasmon-enhanced fluorescence, silver nanoparticles, polyelectrolyte, immunofluorescence assay.

Введение. Простатический специфический антиген (ПСА-общий) — опухолевый маркер, используемый в диагностике рака предстательной железы [1, 2]. Его определение является практически единственным способом выявить заболевание на самой ранней стадии. Концентрация ПСА-общего в сыворотке крови в отсутствие заболеваний предстательной железы 0—4 нг/мл. Содержание 4—10 нг/мл свидетельствует о подозрении на рак предстательной железы, 10—20 нг/мл — о высоком риске заболевания. Повышение концентрации ≥ 40 нг/мл может свидетельствовать о метастазах. При дифференциальной диагностике рака простаты и других заболеваний (гипертрофии, воспаления) большое значение имеет определение ПСА в динамике. Потому задача поиска и отработки конкретных методик количественной экспрессной диагностики весьма актуальна. Основные требования, которые предъявляются к подобным методологическим разработкам, — высокая чувствительность, воспроизводимость результатов, достаточная простота выполнения, относительно низкая стоимость и возможность проведения анализа в максимально короткие сроки.

В настоящее время наночастицы (НЧ) металлов, в частности золота и серебра, используются для создания биосенсоров, основанных на явлении поверхностного плазмонного резонанса [3—6] и плазмон-усиленной флуоресценции [7—15]. Принцип работы данных сенсоров заключается в возможности управления оптическими свойствами системы биомолекула—металл: положением полосы плазмонного резонанса и интенсивностью флуоресценции (ФЛ) в зависимости от концентрации биомолекул. В случае иммунофлуоресцентного анализа вблизи поверхности металлических НЧ происходят локализация электромагнитного излучения падающей световой волны, а также увеличение скорости излучательных переходов, что позволяет повысить интенсивность регистрируемого сигнала флуоресцентной метки, а значит, улучшить аналитические возможности метода.

Количественная иммунодиагностика биологических микро- и макромолекул развивается в направлении минимизации объемов исследуемых образцов, количества расходуемых реагентов и снижения уровня достоверно определяемых концентраций аналита до нано- и пикограммовых количеств. В этих условиях повышение чувствительности иммуноанализа может быть достигнуто с использованием современных нанотехнологических подходов.

В последние годы опубликован ряд работ, посвященных детектированию ПСА с применением плазмонного усиления флуоресценции [8, 16—20], где использованы наноструктуры золота и “красные” флуорофоры в качестве меток. В работах [8, 16, 19, 20] в качестве плазмонных структур применены золотые пленки с возбуждением через призму (схема Кретчманна), в [17] — также золотые пленки и возбуждение в обратной схеме Кретчманна. В [18] использованы наноструктуры, полученные методом электронно-лучевой литографии. В [8, 16, 19] в качестве флуоресцентной метки использован органический краситель Alexa Fluor 647, в [17, 18] — квантовые точки CdSe/ZnS и Qdot-655. Наименьший предел обнаружения ПСА составил 10 фг/мл [17]. Наиболее широкий диапазон концентраций определяемого ПСА (более пяти порядков) продемонстрирован в [19]. Насколько нам известно, серебряные наноструктуры для иммунофлуоресцентного детектирования ПСА ранее не применялись.

Нами ранее получены результаты по усилению флуоресценции меченных изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ) антител, находящихся на расстоянии < 10 нм от серебряной пленки: бычьего сывороточного альбумина [21, 22], иммуноглобулина G человека [23], а также антител к альфа-фетопротейну и комплексов антиген—антитело [24]. Расчеты показали, что для “зеленых” флуорофоров серебро является более подходящим материалом для получения плазмонного усиления ФЛ [25], чем золото, причем оптимальный размер НЧ серебра ~ 50 нм [21].

Цель данной работы — разработка подхода, позволяющего интегрировать НЧ серебра в стандартную процедуру иммунофлуоресцентного анализа ПСА, а также оценка методологических параметров, влияющих на плазмонное усиление флуоресценции в такой системе. НЧ серебра электростатически осаждались на поверхность лунок полистирольных планшетов, широко используемых в иммунологических анализах, с помощью полиэлектролитных слоев, фиксация молекул антител на поверхности серебряной нанопленки также происходила с помощью полиэлектролитов. Это позволило исключить дорогостоящие процедуры при пробоподготовке и регистрации сигнала.

Эксперимент. Золь серебра синтезирован по методу цитратного восстановления нитрата серебра [26]. Эксперименты проводились в 96-луночных полистирольных планшетах для иммуноанализа. Серебряные НЧ осаждали в лунки планшета по следующей схеме: 100 мкл раствора ПДАДМАХ (10 г/л в 0.5 моль/л хлорида натрия) выдерживались в половине лунок планшета в течение 20 мин, затем 100 мкл золя серебра выдерживались в половине лунок планшета в течение 24 ч при комнатной температуре, на последнем этапе 100 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0.5 моль/л хлорида натрия) или раствора поли-L-лизина (20 мкг/мл) выдерживались во всех лунках планшета в течение 20 мин.

Для исследования усиленной флуоресценции антиПСА-ФИТЦ в металлизированные и неметаллизированные лунки планшета, обработанные ПДАДМАХ, добавлялось по 100 мкл растворов антиПСА-ФИТЦ разных концентраций и выдерживалось в течение 40 мин при комнатной температуре. Для удаления несвязавшихся антител лунки дважды промывались буфером Tris-EDTA. Спектры ФЛ зарегистрированы с помощью спектрографа S-3801 (Solar ТП, Беларусь), в качестве детектора использована ПЗС-матрица (Princeton Instruments, США). Возбуждение ФЛ осуществлялось широким спектром излучения коммерческого светодиода с максимумом на $\lambda = 460$ нм и шириной спектра излучения на полувысоте ~ 25 нм.

Использован двуцентровый иммунофлуоресцентный анализ связывания ПСА с мышиными моноклональными антителами: моноклональные антитела, специфичные к ПСА (МАТ1, № 10184, Abcam, Великобритания), сенсibilизированные на твердой фазе и моноклональные антитела (анти-ПСА-ФИТЦ, № 178776, Abcam, Великобритания), специфичные к ПСА и меченные ФИТЦ. В качестве полиэлектролитов при создании пленок из НЧ серебра применяли полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ, $M=200000$ г/моль, Sigma, США) и поли-L-лизин гидробромид ($M = 150000$ — 300000 г/моль, Sigma, США).

В лунки полистирольных планшетов с предварительно иммобилизованными моноклональными антителами МАТ1 добавляли возрастающие количества стандартных растворов ПСА (0, 1, 2.5, 5, 15 и 30 нг/мл). После инкубации при $+37$ °С в течение 1 ч и удаления несвязавшихся реагентов вносили антиПСА-ФИТЦ. По окончании инкубации в темноте при $+37$ °С планшет промывали и проводили измерения интенсивности ФЛ ($\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 518$ нм) на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия-США).

Результаты и их обсуждение. Изображение, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), используемых НЧ серебра представлено на рис. 1, а. Помимо основной массы сферических НЧ со средним размером 50 нм присутствуют единичные НЧ вытянутой формы. На рис. 1, б показаны спектры оптической плотности золя НЧ серебра, пленки НЧ серебра и раствора меченных ФИТЦ антител к ПСА, а также спектр флуоресценции раствора меченых антител. В спектре пленки НЧ серебра (кривая 2) наблюдается характерный максимум в области 425 нм, связанный с плазмонным поглощением НЧ серебра, а также длинноволновое крыло при 600—800 нм, свидетельствующее о формировании агрегатов НЧ. Усиление ФЛ металлическими НЧ может быть связано

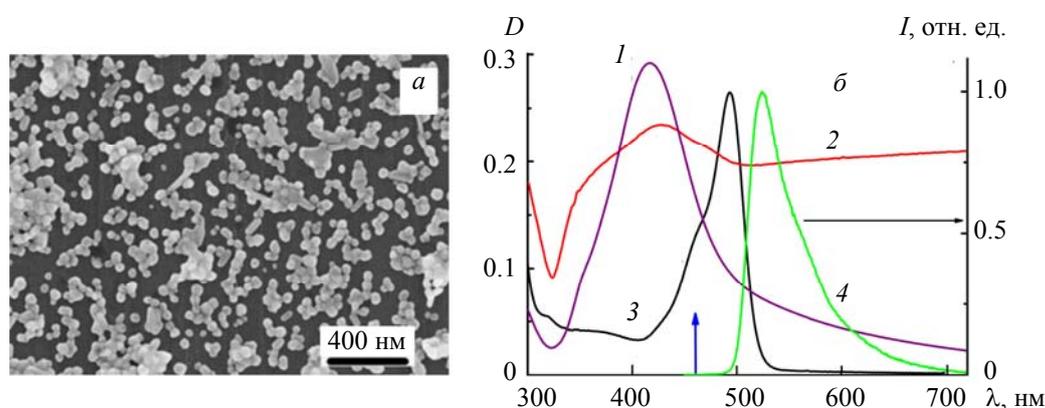


Рис. 1. СЭМ-изображение наночастиц серебра (а), спектры оптической плотности золя серебра (1), пленки наночастиц серебра, осажденных на пластиковую подложку (2), раствора антиПСА-ФИТЦ (3) и спектр флуоресценции антиПСА-ФИТЦ на пластиковой подложке (4); стрелкой показана длина волны возбуждения (б)

как с увеличением интенсивности падающего поля из-за возбуждения плазмонного резонанса, так и с ростом вероятности спонтанного испускания света за счет изменения плотности фотонных состояний [27]. Наиболее эффективное плазмонное усиление ФЛ происходит в случае, когда полоса плазмонного поглощения серебряных НЧ перекрывается как с длиной волны возбуждения (и поглощением меченого белка), так и с люминесценцией метки. Как видно из рис. 1, *a*, в указанных экспериментальных условиях можно ожидать значительного усиления поля на длине волны возбуждения. Выбор $\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм обусловлен компромиссом между необходимостью попасть в область плазмонной полосы и эффективно возбудить флуоресценцию ФИТЦ.

На рис. 2, *a* представлена зависимость интенсивности флуоресценции антиПСА-ФИТЦ от концентрации в присутствии и в отсутствие НЧ серебра. Действительно, при адсорбции меченных ФИТЦ антител на серебряные НЧ, покрытые слоем ПДАДМАХ, интенсивность ФЛ увеличивается по сравнению с интенсивностью в отсутствие серебра (рис. 2, *a*). При этом коэффициент плазмонного усиления ФЛ, определяемый отношением интенсивностей ФЛ метки в присутствии и в отсутствие Ag ($k = I_{\text{Ag}}/I_{\text{no_Ag}}$), также зависит от концентрации меченых антител (рис. 2, *б*). Масса антиПСА-ФИТЦ, осажденного на поверхность подложки, рассчитана с учетом доли молекул антиПСА-ФИТЦ, адсорбируемых на поверхность из раствора, и площади поверхности регистрации флуоресценции. В интервале 0.5—10 мкг/мл (до 0.1 нг осажденных молекул антиПСА-ФИТЦ) коэффициент усиления возрастает на порядок с 1.5 до 12, а затем изменяется не столь значительно. Зависимость коэффициента усиления ФЛ аппроксимируется гиперболой и совпадает по форме с изотермой Лэнгмюра, демонстрирующей насыщение адсорбционного слоя с повышением содержания адсорбата в данном диапазоне концентраций.

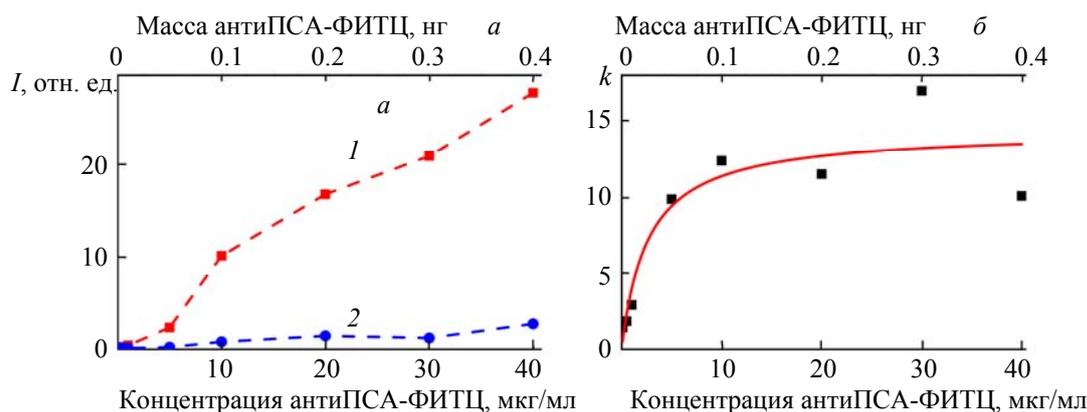


Рис. 2. Зависимости интенсивности флуоресценции антиПСА-ФИТЦ от концентрации в присутствии (1) и в отсутствие (2) наночастиц серебра (*a*) и коэффициента усиления флуоресценции k от концентрации антиПСА-ФИТЦ (сплошная линия — аппроксимирующая гиперболическая функция) (*б*)

Высокий коэффициент усиления ФЛ для больших концентраций антител (в 10—18 раз) обусловлен уменьшением самотушения флуоресцентных меток ФИТЦ в присутствии НЧ серебра благодаря росту вероятностей излучательных переходов [14, 24].

Помимо соответствия оптических характеристик металлических НЧ и флуорофора существует ряд других параметров, влияющих на плазмонное усиление ФЛ, например расстояние металл—флуорофор. Для того чтобы минимизировать безызлучательный перенос энергии из возбужденного состояния флуорофора на металл, часто применяют спейсеры — диэлектрические слои для пространственного разделения плазмонных НЧ и излучателей [13, 28, 29]. В наших предыдущих исследованиях установлено, что максимальное усиление ФЛ наблюдается при расстоянии между биомолекулами и НЧ серебра, соответствующем 1—3 полиэлектролитным слоям (1.4—3.3 нм) [13, 21, 23, 33].

На основании этих данных в лунках полистирольного планшета, покрытых НЧ серебра, использован только один слой полиэлектролита для адсорбции первого компонента иммунохимической тест-системы, так как комплекс “МАТ1*ПСА*антиПСА-ФИТЦ” обладает размерами (~10 нм), достаточными для предотвращения тушения ФЛ меток серебром, поэтому дополнительного отдаления

флуорофора от поверхности серебра не требуется. Кроме того, проведенные ранее расчеты [21, 24] показали, что для излучателя в области 530 нм (ФИТЦ), находящегося вблизи НЧ серебра со средним диаметром ~ 50 нм, коэффициент усиления ФЛ мало зависит от расстояния металл—флуорофор в диапазоне 5—20 нм при $\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм. Рассчитанный коэффициент усиления ФЛ может достигать 5 раз.

Таким образом, предварительно проведенные эксперименты и расчеты позволяют предположить, что нанесение слоя серебра на поверхность лунок планшета способствует повышению эффективности стандартной методики иммунофлуоресцентного анализа ПСА. Для обеспечения специфического связывания ПСА с твердой фазой реализована “сэндвич”-схема анализа. Адсорбция первичного немеченого антитела осуществлялась на лунки с серебряными НЧ и полиэлектролитами, затем следовала процедура стандартного иммуноанализа: связывание ПСА из раствора с первичным антителом и последующее связывание меченных ФИТЦ антител. Затем проводилась регистрация флуоресцентного сигнала. Стандартная процедура иммуноанализа предполагает применение поли-L-лизина для фиксации первичных антител МАТ1 на твердой фазе (серебро и поверхность полистирола) [30—32]. В экспериментах, проведенных до реализации “сэндвич”-схемы [13, 23, 24], для фиксации меченых белков на серебре применялся поликатион ПДАДМАХ. В связи с этим при интеграции серебряных НЧ в процедуру иммунофлуоресцентного анализа на ПСА проводилось исследование влияния не только НЧ серебра, но и природы полиэлектролита в схеме анализа на итоговый флуоресцентный сигнал антиПСА-ФИТЦ.

Для сравнительного анализа влияния двух полиэлектролитов на процессы белковой адсорбции и формирования иммунных комплексов иммунохимическая тест-система помещена в лунки полистирольного планшета, обработанные разными способами: покрытые поли-L-лизином, ПДАДМАХ, комплексом ПДАДМАХ–Ag–поли-L-лизин, комплексом ПДАДМАХ–Ag–ПДАДМАХ. В качестве контроля использован стандартный вариант проведения иммуноанализа с иммобилизацией МАТ1 на интактной поверхности полистирола в лунках планшета. На рис. 3 приведены калибровочные кривые для каждого случая, позволяющие вычислять точную концентрацию анализируемого соединения в пробе. Как видно, проведение анализа в лунках полистирольного планшета, покрытых поли-L-лизином, приводит к увеличению интенсивности ФЛ на 10—17 % по сравнению с контролем (рис. 3, а).

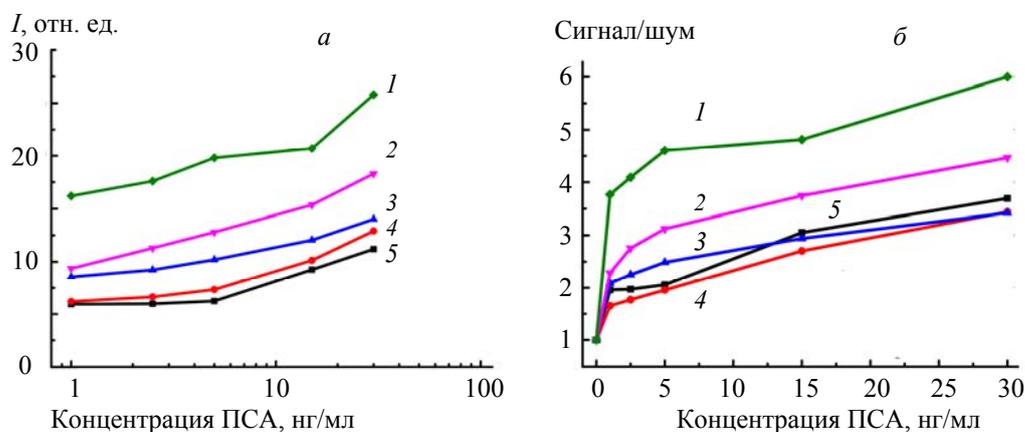


Рис. 3. Калибровочные кривые для детектирования ПСА иммунофлуоресцентным методом (а) и зависимость соотношения сигнал/шум от концентрации ПСА (б) при различной конфигурации твердой фазы: ПДАДМАХ+Ag+ПДАДМАХ (1), ПДАДМАХ+Ag+поли-L-лизин (2), ПДАДМАХ (3), поли-L-лизин (4), контроль (5)

Поли-L-лизин является положительно заряженным гомополимером и слабым полиэлектролитом, что означает зависимость заряда его макромолекул от pH. Это обусловлено строением мономера — аминокислоты лизина, содержащей первичную аминогруппу. Положительный заряд делает возможным его использование для формирования различного рода полиэлектролитных комплексов. Иммобилизованные на полистироле молекулы поли-L-лизина связываются с молекулами моноклонального МАТ1, увеличивая сорбционную емкость поверхности лунки, что способствует увеличению регистрируемого флуоресцентного сигнала.

Использование в качестве подложки для иммунохимической тест-системы слоя другого полиэлектролита — ПДАДМАХ — увеличивает интенсивность ФЛ на 30—45 % по сравнению с контролем.

Молекула ПДАДМАХ представляет собой высокомолекулярный сильнозаряженный полимер, содержащий большое количество заряженных групп и имеющий пространственно нелинейный характер. В отличие от поли-L-лизина ПДАДМАХ, имеющий по всей длине цепи четвертичные аммониевые группы, относится к сильным полиэлектролитам, т. е. заряд макромолекул в растворе не зависит от рН. Известно, что при добавлении солей макромолекулы ПДАДМАХ образуют множественные петли и формируют структуры, похожие на клубки [33, 34]. В результате образуется высокозаряженная и пространственно неплоская поверхность, которая создает благоприятные условия для связывания белковых макромолекул (в нашем случае молекул МАТ1). Стабильность комплексов ПДАДМАХ—белок поддерживается множественными электростатическими и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, а также системой водородных связей, что может приводить к изменению конформации иммобилизованных молекул антител, не только стабилизируя комплекс, но и способствуя увеличению констант связывания антигена в антигенсвязывающих центрах антител. Можно предположить, что увеличение интенсивности флуоресценции, свидетельствующее о возрастании количества связанных моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ с комплексом МАТ1-ПСА на твердой фазе, является результатом как повышения сорбционной способности твердой фазы благодаря наличию слоя ПДАДМАХ, так и увеличения конформационной стабильности образующихся комплексов антиген—антитело. Ранее подобные различия в поверхностной плотности зарядов и константах связывания для ПДАДМАХ и поли-L-лизина были описаны при их взаимодействии с липидным бислоем [35].

Проведение иммуноанализа в лунках, покрытых комплексом ПДАДМАХ—Ag—поли-L-лизин, продемонстрировало увеличение флуоресцентного сигнала в 1.6—2 раза по сравнению с контролем и в 1.4—1.7 раза по сравнению с эффективностью флуоресцентного сигнала при иммобилизации МАТ1 и проведении анализа на твердой фазе, покрытой поли-L-лизином. Данный результат свидетельствует о вкладе плазмонного усиления флуоресценции в общее увеличение регистрируемого сигнала. Наличие поли-L-лизина обеспечивает некоторое увеличение количества молекул МАТ1 на подложке, что повышает общую чувствительность анализа, но не является ведущим фактором в этом процессе.

Использование в качестве подложки комплекса ПДАДМАХ—Ag—ПДАДМАХ показало максимальный рост интенсивности флуоресценции. При этом интенсивность флуоресценции возрастает в 2.3—3.2 раза по сравнению с сигналом, полученным при иммобилизации тест-системы на необработанном полистироле и в 1.8—1.9 раза по сравнению сигналом, полученным при иммобилизации тест-системы на твердой фазе, покрытой ПДАДМАХ в отсутствие серебра.

Таким образом, наблюдается совместное действие двух параллельных процессов: с одной стороны, происходит плазмонное усиление флуоресценции антиПСА-ФИТЦ вблизи НЧ серебра, а с другой — интенсивность сигнала возрастает не менее чем на 20 % из-за увеличения количества первичных антител, связанных с поверхностью полиэлектролита ПДАДМАХ, и общего количества анализируемых молекул. Данный результат интересен тем, что иммобилизация молекул антител на сильнозаряженной поверхности полиэлектролита ПДАДМАХ может изменять их антигенсвязывающие свойства за счет увеличения конформационной подвижности как константных, так и переменных доменов, что создает благоприятные условия для формирования пространственно-комплементарных белковых поверхностей.

Анализ полученных калибровочных кривых для концентраций ПСА в диапазоне 1—30 нг/мл, необходимых в клинической диагностике, показал, что зависимости имеют логарифмический вид. Нелинейный вид зависимости обусловлен, вероятно, увеличением вклада концентрационного тушения с ростом количества меченых антител. На рис. 3, б показаны кривые зависимости сигнал/шум от концентрации ПСА, полученные делением кривых на рис. 3, а на соответствующую интенсивность ФЛ при 0 нг/мл. Видно, что именно присутствие НЧ серебра увеличивает соотношение сигнал/шум до двух раз в зависимости от концентрации аналита и конфигурации твердой фазы. Соотношение сигнал/шум в свою очередь влияет на предел обнаружения [36] и чувствительность детектирования.

Заключение. Продемонстрирована возможность применения плазмон-усиленной флуоресценции с использованием наночастиц серебра в иммунофлуоресцентном анализе низких концентраций простат-специфического антигена. Плазмонный эффект дает повышение интенсивности флуоресцентного сигнала меченных изотиоцианатом флуоресцеина антител в ходе анализа до двух раз. Применение полиэлектролита для сорбции антител на твердую фазу дает дополнительный вклад в увеличение интенсивности флуоресценции. Показано, что при конструировании иммунохимических тест-

систем на пленках из наночастиц серебра существенным является выбор полиэлектролита, которым покрывается пленка серебра, так как физико-химические свойства полиэлектролита могут оказывать значительное влияние на сорбционную емкость твердой фазы и на конформационное состояние и стабильность иммобилизуемых белковых молекул. От этих параметров зависит чувствительность иммунохимической тест-системы, а следовательно, эффективность всего анализа.

В используемых вариантах комбинации различных полиэлектролитов с пленками из наночастиц серебра наилучшими сорбционными и физико-химическими свойствами обладает комплекс ПДАДМАХ–Ag–ПДАДМАХ. В этом случае флуоресцентный сигнал возрастает в 2.3—3.2 раза по сравнению с сигналом, полученным при иммобилизации тест-системы на необработанном полистирольном планшете. Нелинейный вид калибровочных кривых обусловлен, вероятно, увеличением вклада концентрационного тушения с ростом количества меченых антител. В то же время увеличение коэффициента усиления флуоресценции меченых антител с ростом их концентрации на покрытых серебром лунках свидетельствует о подавлении металлическими частицами процессов самотушения флуоресцентных меток. Полученные результаты перспективны как для усовершенствования стандартных методик иммунофлуоресцентного анализа, так и для создания портативного прибора количественной экспрессной диагностики простат-специфического антигена.

- [1] **В. С. Камышников.** Онкомаркеры: Методы определения, референтные значения, интерпретация тестов, Москва, МЕД-пресс Информ (2011)
- [2] **В. С. Первый, В. Ф. Сухой.** Онкомаркеры. Клинико-диагностический справочник, Ростов-на-Дону, Феникс (2012)
- [3] **P. Karami, H. Khoshsafar, M. Johari-Ahar, F. Arduini, A. Afkhami, H. Bagheri.** Spectrochim. Acta A, **222** (2019) 117218
- [4] **P. Damborský, N. Madaboosi, V. Chu, J. P. Conde, J. Katrlík.** Chem. Papers, **69** (2015) 143—149
- [5] **F. Tan, Y. Yang, X. Xie, L. Wang, K. Deng, X. Xia, X. Yang, H. Huang.** Analyst, **143** (2018) 5038—5045
- [6] **H.-M. Kim, J.-H. Park, D. H. Jeong, H.-Y. Lee, S.-K. Lee.** Sens. Actuator B-Chem., **273** (2018) 891—898
- [7] **J. W. Attridge, P. B. Daniels, J.K. Deacon, G. A. Robinson, G. P. Davidson.** Biosens. Bioelectron., **6** (1991) 201—214
- [8] **F. Yu, B. Persson, S. Lofas, W. Knoll.** Anal. Chem., **76** (2004) 6765—6770
- [9] **K. Sokolov, G. Chumanov, T. M. Cotton.** Anal. Chem., **70** (1998) 3898—3905
- [10] **S. M. Tabakman, L. Lau, J. T. Robinson, J. Price, S. P. Sherlock, H. Wang, B. Zhang, Z. Chen, S. Tangsombatvisit, J. A. Jarrell, P. J. Utz, H. Dai.** Nat. Commun., **2** (2011) 466
- [11] **L. Zhou, F. Ding, H. Chen, W. Ding, W. Zhang, S. Y. Chou.** Anal. Chem., **84** (2012) 4489—4495
- [12] **R. Zhang, Z. Wang, C. Song, J. Yang, Y. Cui.** J. Fluoresc., **23** (2013) 551—559
- [13] **O. Kulakovich, N. Strekal, M. Artemyev, A. Stupak, S. Maskevich, S. Gaponenko.** Nanotechnol., **17** (2006) 5201—5206
- [14] **J. R. Lakowicz, J. Malicka, S. D'Auria, I. Gryczynski.** Anal. Biochem., **320** (2003) 13—20
- [15] **K. Okuda.** Digest Dis. Sci., **31** (1986) 133S—146S
- [16] **Y. Wang, A. Brunsen, U. Jonas, J. Dostalek, W. Knoll.** Anal. Chem., **81** (2009) 9625—9632
- [17] **L.-H. Jin, S.-M. Li, Y.-H. Cho.** Biosens. Bioelectron., **33** (2012) 284—287
- [18] **H. Y. Song, T. I. Wong, A. Sadovoy, L. Wu, P. Bai, J. Deng, S. Guo, Y. Wang, W. Knoll, X. Zhou.** Lab. Chip., **15** (2015) 253—263
- [19] **T. Kaya, T. Kaneko, S. Kojima, Y. Nakamura, Y. Ide, K. Ishida, Y. Suda, K. Yamashita.** Anal. Chem., **87** (2015) 1797—1803
- [20] **Q. Zhang, L. Wu, T. I. Wong, J. Zhang, X. Liu, X. Zhou, P. Bai, B. Liedberg, Y. Wang.** Int. J. Nanomed., **12** (2017) 2307—2314
- [21] **О. С. Кулакович, М. В. Артемьев, А. П. Ступак, С. А. Маскевич, С. В. Гапоненко.** Журн. прикл. спектр., **73**, № 6 (2006) 797—800 [О. S. Kulakovich, M. V. Artem'ev, A. P. Stupak, S. A. Maskevich, S. V. Gaponenko. J. Appl. Spectr., **73** (2006) 892—896]
- [22] **D. V. Guzatov, S. V. Vaschenko, V. V. Stankevich, A. Ya. Lunevich, Y. F. Glukhov, S. V. Gaponenko.** J. Phys. Chem. C, **116** (2012) 10723—10733

- [23] **A. A. Романенко, С. В. Ващенко, В. В. Станкевич, А. Я. Луневи́ч, Ю. Ф. Глухов, С. В. Гапоненко.** Журн. прикл. спектр., **81** (2014) 228—232 [**A. A. Ramanenka, S. V. Vaschenko, V. V. Stankevich, A. Ya. Lunevich, Yu. F. Glukhov, S. V. Gaponenko.** *J. Appl. Spectr.*, **81** (2014) 222—225]
- [24] **S. Vaschenko, A. Ramanenka, O. Kulakovich, A. Muravitskaya, D. Guzatov, A. Lunevich, A. Ya. Lunevich, Y. F. Glukhov, S. Gaponenko.** *Proc. Eng.*, **140** (2016) 57—66
- [25] **D. V. Guzatov, S. V. Gaponenko, H. V. Demir.** *Plasmon.*, **13** (2018) 2133—2140
- [26] **P. C. Lee, D. Meisel.** *J. Phys. Chem.*, **86** (1982) 3391—3395
- [27] **S. V. Gaponenko.** *Introduction to Nanophotonic*, CUP, Cambridge (2010) 465
- [28] **F. R. Aussenegg, A. Leitner, M. E. Lippitsch, H. Reinisch, M. Riegler.** *Surf. Sci.*, **189/190** (1987) 935—945
- [29] **N. Strekal, A. Maskevich, S. Maskevich, J. C. Jardillier, I. Nabiev.** *Biopolymers (Biospectroscopy)*, **57** (2000) 325—328
- [30] **K. Takahashi, M. Fukada, M. Kawai, T. Yokoehi.** *J. Immunolog. Method.*, **153** (1992) 67—71
- [31] **L. S. Epstein, J. K. Lunney.** *J. Immunolog. Method.*, **76** (1985) 63—72
- [32] **N. A. Stearns, S. Zhou, M. Petri, S. R. Binder, D. S. Pisetsky.** *PLoS ONE*, **11** (2016) e0161818
- [33] **F. Caruso.** *Adv. Mater.*, **13** (2001) 11—22
- [34] **A. Muravitskaya, O. Kulakovich, P. M. Adam, S. Gaponenko.** *Phys. Status Solidi (b)*, **255** (2018) 1700491
- [35] **A. C. McGeachy, N. Dalchand, E. R. Caudill, T. Li, M. Doğangün, L. L. Olenick, H. Chang, J. A. Pedersen, F. M. Geiger.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20** (2018) 10846—10856
- [36] **V. A. Galievsky, A. S. Stasheuski, S. N. Krylov.** *Anal. Chem.*, **89** (2017) 11122—11128