

УДК 616.71

Разработка бумажного планшета для экспресс-иммунодиагностики

*Дарашкевич Я.О., студент
Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана,
кафедра «Медико-технический менеджмент»*

*Научный руководитель: Аполлонова И.А., к.т.н,
заместитель заведующего кафедрой «Медико-технический менеджмент»
Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана
apollonova-i@bmstu.ru*

Иммунологические анализы, как правило, осуществляются в микротитрационных планшетах (рис.1) или небольших флаконах [1,2]. Такие анализы сочетает в себе избирательность антител с высокой каталитической способностью ферментов или возможностью регистрировать флуоресцентные метки, чтобы обеспечить специфичность и чувствительность анализа [1,2].

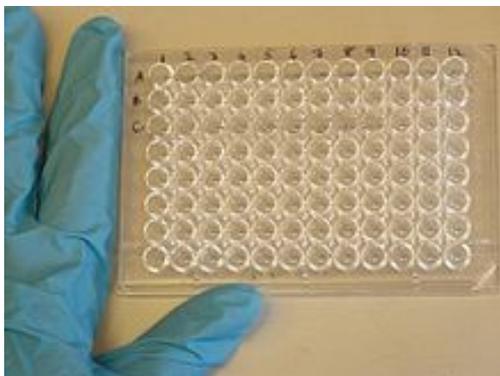


Рис. 1. 96-ячеечный микропланшет, используемый для постановки ИФА

Бумага с нанесенным гидрофобным рисунком в качестве платформы для иммуноферментного анализа была впервые предложена G.M. Whitesides и его коллегами, которые продемонстрировали возможность выполнять многопараметрические анализы на листке бумаги с небольшим объемом образцов и реализовать недорогой, но высококачественный анализ во внелабораторных условиях [3,4,5].

Исследователи, так же, продемонстрировали возможность использования такой бумажной платформы для обнаружения и определения антитела к ВИЧ-1 антигену (gp41) в человеческой сыворотке с использованием антител против человеческого иммуноглобулина, конъюгированных со щелочной фосфатазой, чтобы получить колориметрический расчет (рис.2). Интенсивность наблюдаемого сигнала, полученная колориметрически при помощи конъюгата, пропорциональна количеству обнаруженных антигенов [5].

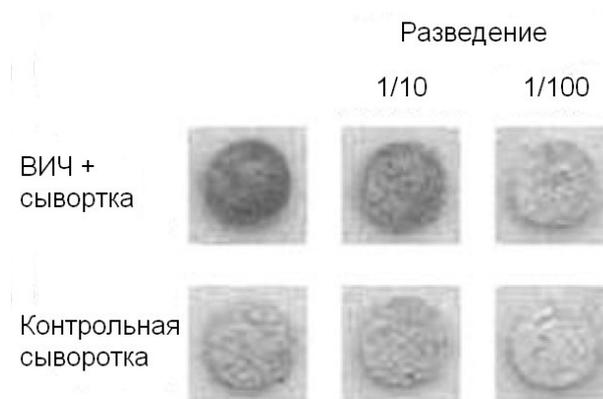


Рис. 2. Результаты анализов сыворотки от ВИЧ-1 инфицированных пациентов и пациентов контрольной группы

Из результатов анализа (см. рис.2) можно заключить, что бумажные планшеты пригодны для использования в качестве платформы для ИФА.

В их работе гидрофобные границы бумажного ИФА-планшета формировали фотолитографически или при помощи полидиметилсилоксана [3,4]. Однако эти методы для создания бумаги с гидрофобным рисунком являются относительно сложными, а материалы - дорогими, что не способствует минимизации затрат для создания тестов на бумажной основе. Поэтому был осуществлен поиск и апробация простых способов для нанесения гидрофобного рисунка на бумагу.

Физически парафин является гидрофобным, пластичным при комнатной температуре веществом, нерастворимым в воде, а в расплавленном состоянии имеющим относительно низкую вязкость.

Рассмотренные способы нанесения рисунка парафином на фильтровальную бумагу:

- стержнем из парафина с включением углеродных нанотрубок на неокрашенную бумагу;
- обведением парафиновым стержнем рисунка, нанесенного принтером;

- печатью твердочернильным принтером.

Первый способ заключается в использовании парафинового стержня, изготовленного заливкой расплавленного парафина с включением углеродных нанотрубок (50 мг на мл парафина) в пластиковую трубку (использовался корпус инсулинового шприца). После застывания стержень парафина выталкивается на необходимое расстояние (2-3 мм) из трубки поршнем. Затем бумага размещается над нагретой до 200°C поверхностью (использовалась электроплита с терморегуляцией), так, чтобы она не касалась поверхности нагревательного элемента, но нагревалась до температуры плавления парафина. Перед нанесением парафина требуется изготовить трафарет будущего рисунка, как показано на рис.3. Далее происходит нанесение парафина из стержня по трафарету. Добавление в парафин углеродных нанотрубок значительно уменьшало растекание расплавленного парафина по бумаге. Расплавленный парафин проникая в бумагу и застывая формирует гидрофобную стенку в толще бумаги.

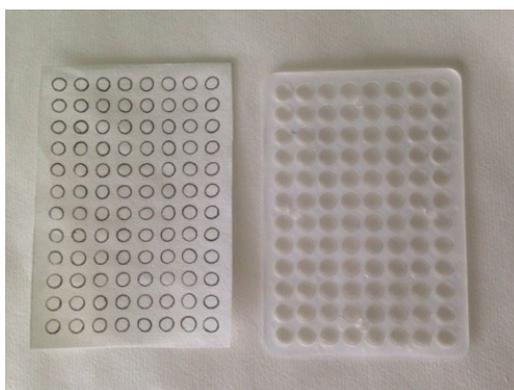


Рис. 3. Бумажная основа с рисунком границ ячеек и трафарет

Следует отметить, что весь процесс очень прост и гидрофобный профиль на бумаге формируется в один этап. В случае простого рисунка процесс занимает меньше минуты. Используемые материалы включают лишь парафиновый стержень, трафарет и обогреватель, которые дешевы и легко доступны. Но для повторения рисунка иммунологического планшета данный способ малопригоден.

Второй способ заключается в распечатке рисунка гидрофобных границ планшета на фильтровальной бумаге с помощью обычного струйного принтера (в данном опыте HP LaserJet серии 1000, США), а затем обведении напечатанного шаблона парафиновым стержнем над нагретой поверхностью. По сравнению с первым, этот метод подходит для

тех случаев, когда требуется сложный дизайн шаблона. Изготовленный таким образом планшет показан на рис.4.



Рис. 4. Бумажный планшет с гидрофобным покрытием: на области бумаги, окрашенные в черный цвет, наносится парафин

Третий способ состоит в печати гидрофобных границ бумажного ИФА-планшета на фильтровальной бумаге непосредственно с помощью твердочернильного принтера (Херох Phaser 8560; разрешение принтера составляет 2400 точек на дюйм dpi_2400)[6,7]. Процесс твердочернильной печати предусматривает нанесение на бумагу тонкого слоя парафина с пигментом (высота парафиновой линии составляет приблизительно 10 мкм, в то время как в данном эксперименте толщина фильтровальной бумаги составляла 120 мкм). После печати парафин растапливается либо в сухожаровом шкафу при 130°C в течение 30 сек., либо над нагретой до 200°C поверхностью. Благодаря пористой структуре фильтровальной бумаги, парафин может проникать вглубь бумажного листа, чтобы сформировать границы между лунками планшета в толще бумаги.

Расплавленный парафин не только проникает через бумагу, но и течет в обоих направлениях от парафиновой линии, что вызвано диффузией парафина и капиллярными силами в бумаге. Таким образом, конечный рисунок будет отличаться от изначально напечатанного. Этот факт нужно учитывать при формировании рисунка границ планшета перед печатью.

При выдерживании бумаги с напечатанными парафиновыми линиями в сушильном шкафу при 60°C в течение 30 мин не наблюдалось никакого дальнейшего расширения линий рисунка. Это показывает, что пропечатанная парафином бумага стабильна и может храниться и использоваться даже при температуре 60°C.

В режиме работы принтера можно напечатать 30 страниц бумаги формата А4 в течение 1 мин, что может быть использовано при массовом производстве бумажных

планшетов. Можно сделать вывод, что этот метод будет наиболее привлекательным для крупномасштабного производства недорогих бумажных биоанализаторов на базе микрофлюидных устройств для применения в отдаленных и труднодоступных регионах.

Минимизация количества используемых химических реагентов снижает производственные затраты, особенно в методе нанесения парафинового рисунка, который мы здесь представили. Описанные методы легки в осуществлении, быстры и дешевы.

Была проведена обычная ферментативная реакция, чтобы охарактеризовать возможности ИФА-планшета на основе бумаги для потенциальных биоаналитических приложений. Ферментативная реакция между тетра-метилбензидином (ТМВ) и пероксидазой хрена (HRP) является основой колориметрического анализа. В данном случае ТМВ, катализируемый HRP, превращается в продукт синего цвета. Сначала был нанесен раствор HRP струйным принтером на гидрофильные зоны бумажного планшета, при этом необходимо позволить реагентам высохнуть. После добавления 10 мкл раствора ТМВ в центр лунки планшета, жидкость равномерно распределилась по его гидрофильной поверхности, при соединении реагентов образовался продукт синего цвета. Ту же процедуру провели с различным количеством ТМВ: 5, 2.5, 1 и 0.5 мкл (рис.4.).

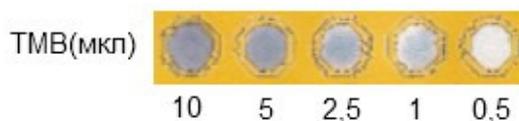


Рис. 4. Результаты колориметрического анализа между ТМВ и HRP

Количественный колориметрический анализ был проведен с помощью программного обеспечения ImageJ, что показано на рисунке 5.

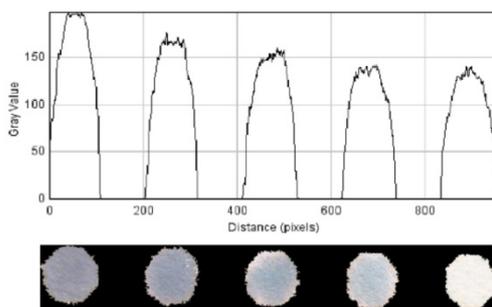


Рис. 5. Результаты программной обработки изображения в программе ImageJ

Из результатов колориметрического анализа наблюдается пропорциональная зависимость интенсивности окраски бумаги от концентрации реагирующего вещества, при этом не наблюдается растекания этих веществ по планшету.

Заключение

По результатам исследования самым результативным способом нанесения гидрофобного покрытия оказался метод с использованием твердочернильного принтера. Парафиновый рисунок, нанесенный таким способом, не меняет форму при температурах до 60 °С и не позволяет растекаться жидким веществам вне границ гидрофобного рисунка. Таким образом, можно утверждать о пригодности данного метода для создания бумажного планшета для иммунологических анализов.

Список литературы

1. Edwards R. Immunodiagnosics. Oxford: Oxford University Press, 1999, 281 p.
2. Diamandis E.P. Immunoassay. St.Louis: Academic Press, 1996, 580 p.
3. Martinez A.W., Phillips S.T., Butte M.J., Whitesides G.M.. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low Volume, and Portable Bioassays // *Angew. Chem.* 2007, № 119, pp. 1340 – 1342.
4. Carrilho E., Phillips S.T., Vella S.J., Martinez A.W., Whitesides G.M.. Paper Microzone Plates // *Anal. Chem.* 2009, №81, pp. 5990 – 5998.
5. Chao-Min Cheng, A.W. Martinez, Jinlong Gong, C.R. Mace, S.T. Phillips, E. Carrilho, K.A. Mirica, M. J. Butte, G. M. Whitesides. Paper-Based ELISA // *Angew. Chem.* 2010, №122, pp. 4881 – 4884.
6. Kaigala G.V., Ho S., Penterman R., Backhouse C.J. Rapid Prototyping of Microfluidic Devices with a Wax Printer // *Lab Chip* 2007, №7, pp. 384–387.
7. Maltezos G., Garcia E., Hanrahan G., Gomez F.A., Vyawahare S., van Dam R. M., Chen Y., Scherer A. Design and fabrication of chemically robust three-dimensional microfluidic valves // *Lab Chip* 2007, №7, pp. 1209–1211.