

БИОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 541.13+544.6+541.138.3:539.2:539.216

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ

В. В. Джелали

*Государственное учреждение Институт микробиологии и иммунологии
им. И. И. Мечникова АМН Украины, 61057, г. Харьков, ул. Пушкинская, 14-16
(0572) 667105. e-mail: vvdgelali@gmail.com.*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ

В. В. Джелали

Аннотация. В работе описан разработанный нами метод высокоскоростной циклической вольтамперометрии для экспресс-идентификации антигенов и антител микроорганизмов. Количественное распознавание комплементарных антител и антигенов производили с помощью созданных биосенсорных систем. В их состав входит распознающая, биологически активная промежуточная фаза.

Измерения циклических вольтамперных характеристик (ЦВАХ) осуществляли с помощью компьютеризированного потенциодинамического комплекса. Регистрировали триады: потенциал – E , ток – j , время – t . Из ЦВАХ определяли $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ зависимости. Их анализ показал, что для всех исследованных межфазных границ, содержащих в качестве распознающей фазы антитела или антигены золотистого стафилококка (*S. aureus*) коэффициент корреляции r^2 между теоретическими и экспериментальными концентрациями не выходил за пределы диапазона $0,960 \div 0,996$.

Разработанный метод позволил увеличить точность и воспроизводимость измерений и дал возможность идентифицировать штаммы микроорганизмов за более короткий промежуток времени, который во многих случаях является критическим параметром.

Ключевые слова: иммунный биосенсор, *S. aureus*, высокоскоростная циклическая вольтамперометрия, распознающая фаза, антигены, антитела

КІЛЬКІСНА ЕКСПРЕС-ІДЕНТИФІКАЦІЯ АНТИГЕНІВ І АНТИТІЛ

В. В. Джелалі

Анотація. У роботі описан розроблений нами метод високошвидкісної циклічної вольтамперометрії для експрес-ідентифікації антигенів та антитіл мікроорганізмів. Кількісне розпізнавання комплементарних антитіл і антигенів проводили за допомогою створених біосенсорних систем. До їх складу входить біологічно активна проміжна фаза.

Вимірювання циклічних вольтамперних характеристик (ЦВАХ) здійснювали за допомогою комп'ютеризованого потенціодінамічного комплексу. Реєстрували тріади: потенціал - E , ток - j , час - t . З ЦВАХ визначали $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{екс}})$ залежності. Їх аналіз показав, що для всіх досліджених міжфазних кордонів, що містять біологічно активну проміжну фазу антитіл або антигенів золотистого стафілокока (*S. aureus*) коефіцієнт кореляції r^2 між теоретичними і експериментальними концентраціями не виходив за межі діапазону $0,960 \div 0,996$.

Розроблений метод дозволив збільшити точність і відтворюваність вимірювань і дав можливість ідентифікувати хвороботворні штами мікроорганізмів за більш короткий проміжок часу, який у багатьох випадках є критичним параметром.

Ключові слова: імунний біосенсор, *S. aureus*, високошвидкісна циклічна вольтамперометрія, біологічна проміжна фаза, антигени, антитіла

QUANTITATIVE RAPID IDENTIFICATION OF ANTIGENS AND ANTIBODIES

V. V. Jelali

Abstract. In this paper we describe our method of high-speed cyclic voltammetry for rapid identification of microbial antigens and antibodies. Quantitative detection of complementary antibodies and antigens carried out by developed biosensor systems. They contain recognizing a biologically active intermediate phase.

Measurement of cyclic current-voltage characteristics (CCVC) was performed using a computerized potentiodynamic complex. Recorded triad potential - E , current - j , time - t . From CCVC determined $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{екс}})$ dependence. Their analysis revealed that for all the interfaces, containing, as the recognition phase, the antibody or antigen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) correlation coefficient r^2 between theoretical and experimental concentrations did not exceed the range $0,960 \div 0,996$.

The developed method has allowed to increase the accuracy and reproducibility of measurements and made it possible to identify the species of microorganisms in a shorter period of time, which in many cases is critical.

Keywords: immune biosensor, *S. aureus*, high-speed cyclic voltammetry, recognizing phase, antigens, antibodies

Введение

Регистрация патогенных микроорганизмов в буферных растворах фоновых электролитов моделирующих физиологическую жидкость организма является одним из основных заданий медицины, биохимии и электрохимических методов анализа. Во многих случаях кроме теста на наличие антигенов (АГ) или антител (АТ) в пробе необходимо знать и их концентрацию. Однако на сегодняшний день в медицинской практике отсутствуют методы их количественной идентификации. Для регистрации электрических информационных сигналов от биосенсорных систем наиболее часто

используют потенциометрию, метод электропроводности или проводимости и их дифференциальную модификацию для определения сопротивления биологического раствора R_p и хроноамперометрию [1–4]. Альтернативой этим методам является циклическая вольтамперометрия (ЦВА) [5, 6, 7] данные которой можно использовать для определения вида зависимости $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{екс}})$ и их анализа [8]. Однако в литературе отсутствует описание количественного метода ЦВА для определения АГ и АТ.

Главным элементом биосенсора является наноразмерная по координате электрохимической реакции распознающая промежуточная

органическая фаза, содержащая биологически активные компоненты. Конденсация таких фаз на углеродистую инертную матрицу приводит к неконтролируемой их толщине и поэтому требует доработки. Инкорпорирование антител и антигенов в такую матрицу и сохранение длительной стабильности представляет значительные трудности. Для уменьшения сопротивления электросинтезированных пленок полимеров в их матрицу инкорпорировывают наночастицы Au, Pt, сульфиды металлов, металлоорганические кластеры [3]. Скорость переноса электронов через межфазные границы, модифицированные наночастицами Au, Ag, или углеродными нанотрубками, возрастает [9].

Проблема лечения гнойно-воспалительных и послеоперационных инфекционных осложнений, вызванных золотистым стафилококком (*S. aureus*), весьма актуальна. Такое положение вещей связано как с высокой распространенностью, так и с резистентностью этого возбудителя к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим препаратам. На данный момент не внедрено в производство ни одной экспрессной тест-системы для выявления антигенов *S. aureus* (АГ *S. aureus*) и токсинов *S. aureus*. Отсутствуют также тест-системы для определения уровня привитости людей и животных.

Целью данной работы является разработка метода количественного распознавания комплементарных антител и антигенов микроорганизмов с помощью высокоскоростной циклической вольтамперометрии и создание биосенсоров для регистрации иммунных реакций комплексообразования между АТ *S. aureus* и АГ *S. aureus*.

Методика эксперимента

Материалы. В экспериментах использовали глобулин человека антистафилококковый АТ *S. aureus* производства Николаевской станции переливания крови и АГ *S. aureus*.

Подготовка растворов электролитов. В качестве фонового раствора электролита использовали фосфатный буферный раствор (PBS [10]) с $\text{pH} = 7,4$. Растворы АТ *S. aureus*

и АГ *S. aureus* в PBS готовили на бидистиллированной воде. Раствор пираньи представлял собой смесь H_2O_2 и концентрированной H_2SO_4 в соотношении 1:3. Все использованные в экспериментах химические реактивы были марки х.ч.

Подготовка электродов. В качестве подложек для биосенсоров использовали поликристаллические Pt и Au квалификации о.с.ч. 00. Pt и Au прямоугольные электроды подготавливали по следующей методике: очищали в растворе концентрированной HNO_3 в течении 40 мин. и затем промывали бидистиллятом. Перед нанесением двумерных пленок дополнительную очистку электродов от органических примесей и физических загрязнений производили путем выдерживания их 40 мин при $T = 40^\circ\text{C}$ в растворе пираньи [11].

Электрохимическая ячейка. В экспериментах использовали специально сконструированную, термостатируемую стеклянную ячейку с рабочим объемом 4 мл, удовлетворяющую всем требованиям, предъявляемым для прецизионных измерений. Рабочий, вспомогательный и отсек электрода сравнения отделялись друг от друга стеклянными шлифами.

Измерительная аппаратура. Регистрацию циклических вольтамперных характеристик (ЦВАХ) осуществляли с помощью потенциостата ПИ – 50.1.1, управляемого программатором ПР – 8 и цифрового осциллографа RIGOL DS1022DC. Регистрировали триады: время – t , ток – j и потенциал – E . Запись экспериментальных данных осуществляли в файл с расширением xls.

На рис. 1 показано изображение одного из экранов монитора, на который выводятся экспериментальные данные. Интерактивное управление работой измерительного компьютеризированного комплекса осуществляли через графический программный интерфейс цифрового осциллографа RIGOL DS1022DC. В работе все потенциалы приведены в шкале н.в.э.

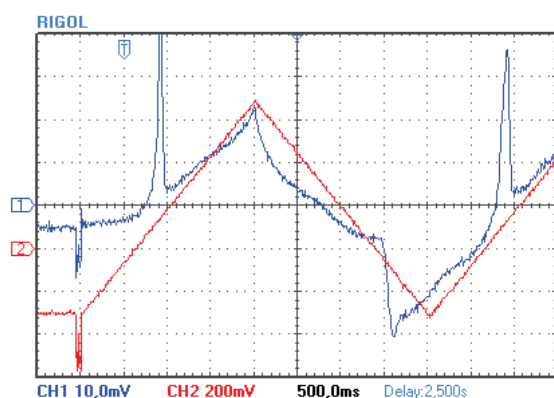


Рис. 1. Файл с расширением bmp, в который записывается графическое изображение эксперимента

Экспериментальные данные и их обсуждение

На рис. 2 показаны экспериментальные $E = f(t)$ и $j = f(t)$ зависимости, полученные от межфазной границы Pt|PBS при наложении на неё первых 5 потенциодинамических треугольных импульсах напряжения заданных программатором ПР – 8. Из графика следует, что $j = f(t)$ зависимости на 1 шаге искажены и не могут быть использованы для анализа циклических ЦВАХ. Начиная с третьего шага поляризации системы, $j = f(t)$ зависимости устойчивы во времени. Полученные из них $j = f(E)$ зависимости практически не меняются во времени. Такая квазистационарность и воспроизводимость ЦВАХ для систем Pt|PBS и Au|PBS позволяет использовать их в качестве основы для построения биосенсорных устройств. В дальнейших экспериментах начало записи данных было синхронизировано с началом 3 шага треугольной развёртки по напряжению. В большинстве случаев при большой зашумлённости измеренных сигналов использовали калибровку напряжения по временному сигналу, а токовый сигнал усредняли. При этом точность измерений возрастала на порядок.

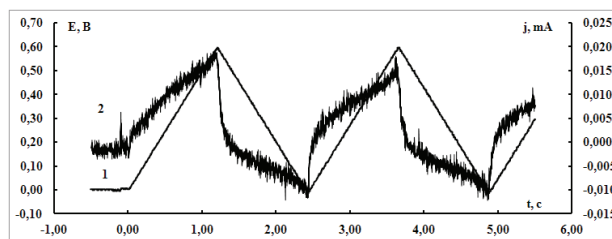


Рис. 2. Экспериментальные зависимости $E = f(t)$ и $j = f(t)$ для системы Pt|PBS.

Выбор величины крутизны развертки по потенциалу K осуществляли путем измерения ЦВАХ при их различных значениях (рис. 3). Из сопоставления этих ЦВАХ следует, что при скорости развертки по потенциалу $s = 5 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$ и заданной площади золотых или платиновых электродов предпочтение необходимо отдать значению $K = 10 \text{ мА} \cdot \text{В}^{-1}$, когда достигается достаточное быстродействие потенциостата, и в тоже время наблюдается приемлемый уровень шумов и достаточный уровень токового сигнала для регистрации его с высокой точностью.

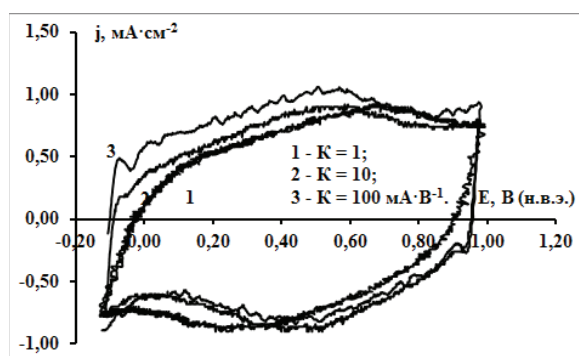


Рис. 3. ЦВАХ измеренные в системе Au|PBS при различной крутизне развертки по потенциалу K , $\text{мА} \cdot \text{В}^{-1}$: 1 – 1; 2 – 10; 3 – 100. Скорость развертки $s = 5 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$.

Материал подложек. Поскольку большая часть биосенсоров, в состав которых входит распознающая промежуточная фаза, являются электрохимическими устройствами, то их работоспособность и воспроизводимость измеренных данных в значительной степени зависит от материала подложки, его чистоты и коррозионной стойкости. При конструировании подложек электрохимических сенсорных устройств используют чистые Pt, Au, SiO_2 и

стеклоуглеродные, графитовые, алмазные или керамические материалы квалификации о.с.ч. 00 или о.с.ч. 000. Биосенсоры для особых целей содержат подложки из сверхчистых монокристаллов металлов с ориентированными индексными гранями, например Pt (001), Pt (010) или Pt (111) или монокристаллы оксидов [12]. Для массового производства биосенсоров можно использовать Pt о.с.ч. 00 и Au о.с.ч. 00.

Воспроизводимость экспериментальных данных. Воспроизводимость ЦВАХ для Au|PBS и Pt|PBS проверяли путем измерения их для одной и той же системы через разные промежутки времени. На рис. 4 представлены ЦВАХ измеренные для системы Au|PBS при различном времени выдержки золотого электрода в растворе PBS. Сравнение полученных ЦВАХ показывает, что, по крайней мере, в течение 24 часов исследуемая граница стабильна, полностью воспроизводима и не меняет своих электрохимических характеристик во времени. При этом ошибка измерений составляет менее 3 %. Небольшие изменения токов, как при анодной, так и при катодной развертке по потенциалу при $\tau_b = 48$ часов, обусловлены как смешиванием католита и анолита, так и обеднением растворов определенными компонентами. До 24 часов такого смешивания и обеднения раствора PBS не наблюдается.

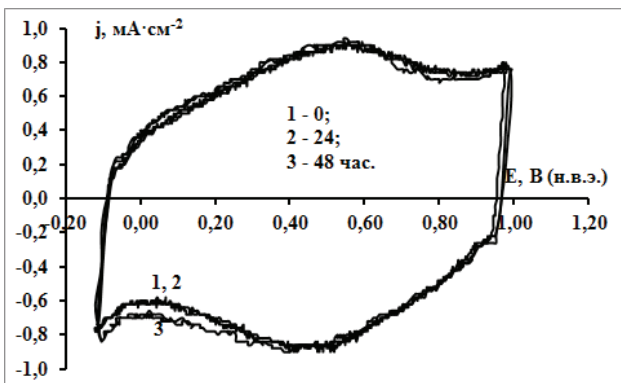


Рис. 4. ЦВАХ измеренные в системе Au|PBS без перемешивания раствора через разные промежутки времени выдержки золотого электрода в растворе PBS, t (часы): 1 – 0; 2 – 24; 3 – 48.

Второй тип проверки воспроизводимости данных заключался в том, что измерения ЦВАХ производили на золотых и платиновых

электродах с разной площадью и геометрической конфигурацией. Так на рис. 5 показаны ЦВАХ, измеренные на золотых электродах, имевших разную площадь и конфигурацию. Сопоставление их показывает, что различия между ними малы и связаны с небольшими отличиями в гидродинамических режимах подвода и отвода продуктов и реагентов электрохимических реакции [13].

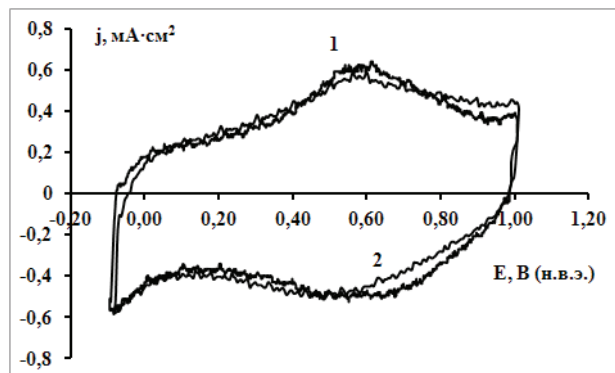


Рис. 5. ЦВАХ измеренные в системе Au|PBS перемешивание раствора при различных размерах и конфигурации золотого электрода: 1 – игольчатый золотой электрод с $S = 0,306 \text{ см}^2$; 2 – прямоугольный золотой электрод с $S = 1,04 \text{ см}^2$.

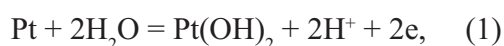
Таким образом, измеренные ЦВАХ воспроизводимы. Следовательно, применяемые нами методы подготовки растворов и электродов к измерениям и уровень их чистоты соответствует поставленным в работе задачам, а золотые и платиновые электроды действительно могут использоваться в качестве подложек в биосенсорах. По сравнению с подложками из других конструкционных металлов, сплавов и материалов они имеют низкую (Au) или нулевую (Pt) скорость коррозии, что благоприятно сказывается на стабильности и воспроизводимости измеренных ЦВАХ.

Выбор области поляризации подложек.

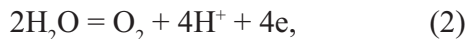
С целью определения области потенциалов, при которой Pt– и Au– электроды могут применяться в качестве подложек биосенсорных устройств, необходимо изучить устойчивость, неизменность и воспроизводимость ЦВАХ в системах Au|PBS и Pt|PBS. Желательно, чтобы в этой области потенциалов скорость ка-

тодных и анодных фарадеевских процессов связанных с разрядом или ионизацией катионов и анионов фонового раствора электролита была минимальной. Для этого нами проведено изучение электрохимического поведения Pt о.с.ч. 00 и Au о.с.ч. 00 в фоновом электролите, в качестве которого использовали фосфатный буферный раствор следующего состава: 8 г·л⁻¹ NaCl, 0,2 г·л⁻¹ KCl, 1,44 г·л⁻¹ Na₂HPO₄, 0,24 г·л⁻¹ KH₂PO₄, pH = 7,4.

На рис. 6 показаны серии ЦВАХ от межфазной границы Au| PBS, а на рис. 7 от межфазной границы Pt| PBS, в зависимости от начала развертки потенциала. Максимальный анодный потенциал ЦВАХ был выбран на 0,020 В ($E_p = 0,98$ В) выше равновесного потенциала разряда воды по механизму [14]:



которая при pH = 7,4 практически заторможена и на 0,229 В ($E_p = 1,229$ В) ниже потенциала разряда молекул воды по механизму [15]:



которая также заторможена, что особенно хорошо видно по отсутствию максимумов токов восстановления кислорода при 0,60 В в катодных циклах ЦВАХ на Pt электродах (рис. 7).

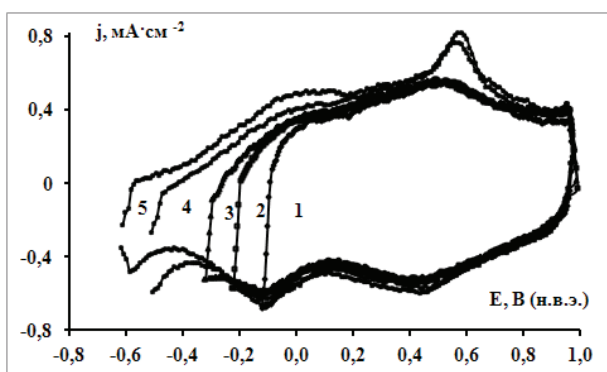


Рис. 6. ЦВАХ в системе Au| PBS с pH = 7,4. Рабочий электрод – Au00. $S = 0,903$ см². Крутизна 10 mA·В⁻¹. Скорость развертки $s = 5$ В·с⁻¹. Шаг 8 равен: 1 – 0,10; 2 – 0,20; 3 – 0,30; 4 – 0,50; 5 – 0,60 В (н.в.э.).

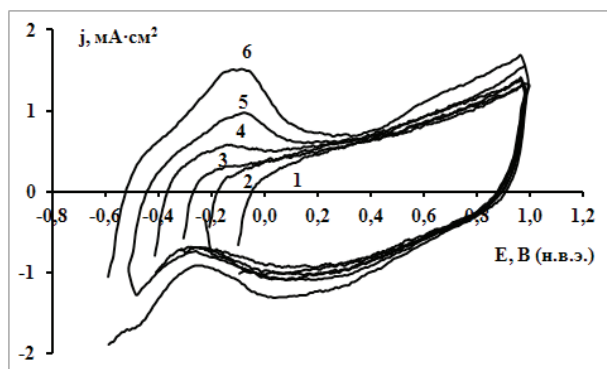


Рис. 7. ЦВАХ в системе Pt| PBS с pH = 7,4. Рабочий электрод – Pt 00. $S = 0,53$ см². Крутизна 10 mA·В⁻¹. Скорость развертки $s = 5$ В·с⁻¹. Шаг 8 равен: 1 – 0,10; 2 – 0,20; 3 – 0,30; 4 – 0,40; 5 – 0,50; 6 – 0,60 В (н.в.э.).

Из формы этих ЦВАХ следует, что протекающий через межфазную границу ток в рассматриваемых случаях описывается уравнением [16]:

$$j = j_\phi + j_3, \quad (3)$$

где j_ϕ – фарадеевский ток, а j_3 – ток заряжения. В развернутом виде его можно записать так:

$$j = \omega C_\phi + j_3, \quad (4)$$

где C_ϕ – емкость фарадеевской реакции, ω – круговая частота переменного тока. Поставив в соответствие частоте переменного тока скорость развертки по потенциалу s . Тогда из (4) получаем:

$$j = asC_\phi + j_3, \quad (5)$$

где a – коэффициент пропорциональности между ω и s .

В соответствии с уравнением (5) вольт–амперметрические максимумы на ЦВАХ (рис. 6) при анодной развертке потенциала (0,52 В) и при катодной развертке потенциала (0,44 В) связаны с электродными стадиями фарадеевского разряда и ионизации золотых фосфатных комплексов или их адсорбцией–десорб-

цией. Для Pt электрода в области потенциалов от 0,20 до 1,00 В, как для анодной, так и для катодной поляризации наблюдается практически линейная зависимость тока от потенциала, обусловленная в основном только токами заряжения. Таким образом, фарадеевские токи на Pt электроде значительно ниже фарадеевских токов на Au электроде и не дают существенного вклада в суммарный ток, протекающий через эту межфазную границу.

Сопоставление ЦВАХ рис. 6 и рис. 7 показывает, что при циклировании потенциала в диапазоне от $-0,30$ до $1,00$ В устойчивость, воспроизводимость и неизменность ЦВАХ для обоих электродов сохраняется. Поэтому именно этот диапазон потенциалов необходимо использовать для исследования свойств создаваемых биосенсоров.

Количественная экспресс-идентификация антигенов и антител микроорганизмов

Основываясь на фундаментальных исследованиях создания и конструирования биосенсорных систем для регистрации различных штаммов микроорганизмов и используя опыт, накопленный нами при проведении экспериментальных работ, для создания биосенсора на золотистый стафилококк были предложены следующие структурные схемы построения промежуточной распознающей фазы:

Биосенсор, структурная схема которого показана на рис. 8, предназначен для регистрации возбудителей инфекционных болезней. Вторая схема (рис. 9) построения биосенсора может быть использована для контроля привитости населения от того или иного микроорганизма. Показанные на рисунках схемы построения биосенсоров имеют универсальный характер и могут быть использованы для регистрации любых АТ и АГ и в частности для регистрации АТ *S. aureus* или АГ *S. aureus*. Эти схемы могут быть модифицированы и видоизменены для построения электрохимических биосенсоров в соответствии со схемами, применяемыми в иммуноферментном анализе (ИФА) [17].

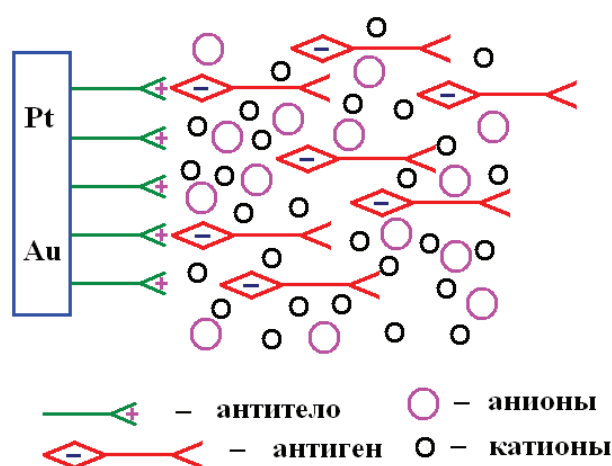


Рис. 8. Структурная схема электрохимического биосенсора, распознающего антигены микроорганизмов.

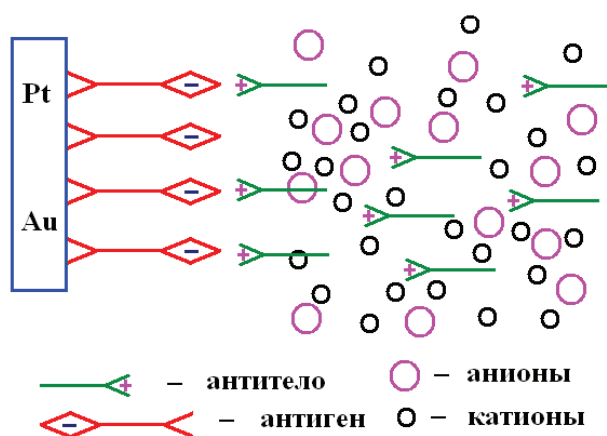


Рис. 9. Структурная схема электрохимического биосенсора, распознающего антитела.

На основании вышеизложенного, в качестве объектов исследования были выбраны следующие межфазные границы:

$$\text{Pt} | 1 \text{ НАНО ИМ АТ } S.aureus | x \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ АГ } S.aureus \text{ в PBS}; \quad (6)$$

$$\text{Pt} | 1 \text{ НАНО ИМ АГ } S.aureus | x \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ АТ } S.aureus \text{ в PBS}; \quad (7)$$

$$\text{Au} | 1 \text{ НАНО ИМ АТ } S.aureus | x \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ АГ } S.aureus \text{ в PBS}; \quad (8)$$

$$\text{Au} | 1 \text{ НАНО ИМ АГ } S.aureus | x \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ АТ } S.aureus \text{ в PBS}; \quad (9)$$

Pt | 1 НАНО ИМ псевдо ФАТ *S.aureus* | x
мкг·мл⁻¹ АГ *S.aureus* в PBS; (10)

Au | 1 НАНО ИМ псевдо ФАТ *S.aureus* | x
мкг·мл⁻¹ АГ *S.aureus* в PBS, (11)

где: 1 НАНО ИМ АГ *S.aureus* – иммобилизованный наноразмерный мономолекулярный слой антител *S. aureus*, 1 НАНО ИМ АГ *S.aureus* – иммобилизованный наноразмерный мономолекулярный слой антигенов *S.aureus*, 1 НАНО ИМ псевдо ФАТ *S.aureus* – иммобилизованный наноразмерный мономолекулярный слой фракции низко молекулярных псевдо антител *S.aureus*.

На поверхность Au и Pt электродов с помощью специальной методики наносили мономолекулярные слои АГ *S.aureus* или АТ *S.aureus*. Иммобилизацию АТ *S.aureus* и АГ *S.aureus* производители в соответствии с технологией, описанной в работах [18 – 20] и применяемой для иммобилизации АТ и АГ на графитовых подложках. В нашем случае она оказалась очень эффективной при связывании АТ и АГ на хорошо очищенных от органических примесей и обезжиренных в растворе пираньи платиновых и золотых подложках. После иммобилизации антител или антигенов модифицированные электроды использовали в качестве биосенсора.

На рис. 10 представлены ЦВАХ, полученные в системе (8) с использованием таким образом подготовленных электродов. Увеличение концентрации в растворе и дальнейшие измерения ЦВАХ в системе осуществляли через равные промежутки времени, которые от системы к системе менялись в пределах 4 – 10 мин. Из рис. 10 следует, что параметры ЦВАХ зависят от концентрации антигена в буферном растворе. Практически во всех исследованных случаях с увеличением концентрации АГ, введенного в раствор PBS, токи, протекающие через исследованные системы, падают. Стационарность токов после введения в систему очередной порции концентрированного АГ происходит за несколько секунд. Этому способствует перемешивание исследуемых растворов, находящихся в измерительном отсеке электрохимической ячейки и малый рабочий

объем ячейки (4 мл). Но наибольшее влияние на время установления стационарных токов, протекающих через исследуемые межфазные границы, оказывает толщина биологически активной мембраны. Чем меньше толщина такой мембраны, тем быстрее устанавливается динамическое равновесие. По сравнению с другими работами, нами достигнута наименее возможная толщина распознающей фазы, и следовательно получено максимально достижимое быстрое действие созданного биосенсора.

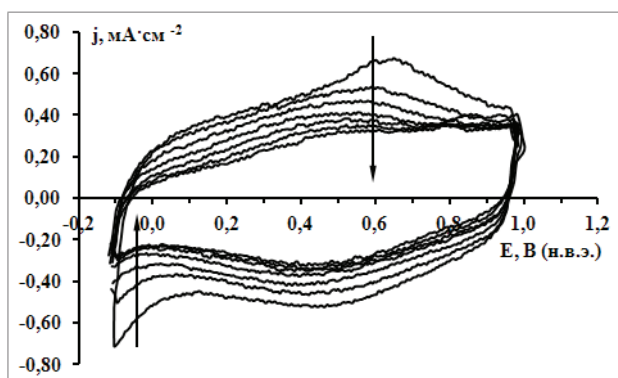


Рис. 10. ЦВАХ в системе Au | 1 НАНО ИМ АГ *S.aureus* | x мкг·мл⁻¹ АГ *S.aureus* в PBS. Рабочий электрод – Au 00. S = 0.903 см². Крутизна 10 мА·В⁻¹. Скорость развёртки потенциала s = 5 В·с⁻¹. 1 – 0; 2 – 1,25; 3 – 4,32; 4 – 10,6; 5 – 35,6; 6 – 85,6; 7 – 210 мкг·мл⁻¹.

Срезы ЦВАХ (рис.10) при выбранных для анализа потенциалах представляют собой хроноамперограммы в координатах $j = f(t)$, так как каждая последующая кривая снята через равные промежутки времени. На рис. 11 при E = - 0,05 В и E = 0,70 В и на рис. 12 при E = 0,20 В и E = 0,60 В показаны полученные по такой методике хроноамперограммы. Так как каждая ЦВАХ представляет собой суперпозицию вкладов сумм парциальных анодных и катодных токов в общий ток, причем каждый парциальный ток имеет свою экспоненциальную зависимость от своего перенапряжения, поэтому хроноамперные зависимости также имеют сложный характер и при разных потенциалах существенно отличаются друг от друга. Если мы хотим продвинуться в область измерения малых концентраций АГ, то такое

поведение ЦВАХ позволяет выбрать те из них, при которых влияние малых добавок АГ приводит к существенным изменениям суммарных токов. При заданном потенциале отклонение экспериментальных ЦВАХ от ЦВАХ в фоновом PBS на 3σ позволяет получить достоверный результат определения АГ или АТ. Из сопоставления данных, приведенных на рис. 11 и рис. 12 следует, что наибольшие сдвиги тока при малых добавках АГ наблюдаются при $E = 0,60$ В в области потенциодинамического анодного максимума и при $E = -0,05$ В в области экспоненциального роста катодного тока. Варьирование потенциала, при котором осуществляется срез ЦВАХ во времени, позволяет определить потенциал, при котором хроноамперограмма биосенсора имеет максимальную чувствительность по току к малым концентрациям АГ.

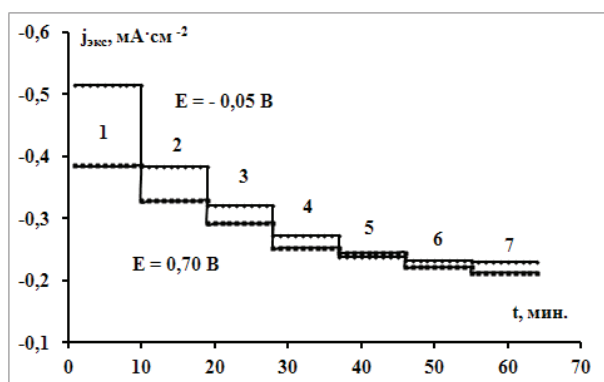


Рис. 11. $j = j(t)$ в системе Au|1 НАНО ИМ АТ S.aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ S.aureus в PBS при $E = -0,05$ В и $E = 0,70$ В. 1 – 0, 2 – 1,25, 3 – 4,32, 4 – 10,6, 5 – 35,6, 6 – 85,6, 7 – 210 мкг·мл⁻¹.

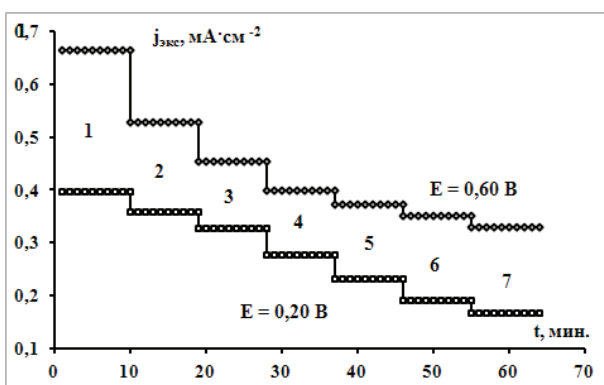


Рис. 12. $j = j(t)$ в системе Au|1 НАНО ИМ АТ S.aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ S.aureus в PBS при $E = 0,20$ В и $E = 0,60$ В. 1 – 0, 2 – 1,25, 3 – 4,32, 4 – 10,6, 5 – 35,6, 6 – 85,6, 7 – 210 мкг·мл⁻¹.

На рисунке 13 показана рассчитанная при $E = 0,60$ В зависимость теоретического тока – $j_{\text{теор}}$ от экспериментального – $j_{\text{эксп}}$. Обращает на себя внимание уравнение связи между $j_{\text{теор}}$ и $j_{\text{эксп}}$. В этом случае коэффициент корреляции $r^2 = 0,980$. Он указывает на равенство $j_{\text{теор}} = j_{\text{эксп}}$. Аналогичный тип связи существует между $j_{\text{теор}}$ и $j_{\text{эксп}}$ при $E = -0,05$ В.

На рис. 14 и 15 показаны $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{эксп}})$ зависимости для обсуждаемых хроноамперограмм. Теоретически рассчитанные и экспериментально заданные концентрации АГ S.aureus в буферном растворе PBS для катодных и анодных циклов связаны равенством $c_{\text{теор}} = c_{\text{эксп}}$, поскольку коэффициенты корреляции для них соответственно равны 0,98 и 0,93. Полученные коэффициенты корреляции указывают на то, что разработанный биосенсор для определения АГ S.aureus высокоэффективен. Это позволяет использовать его в лабораторной практике.

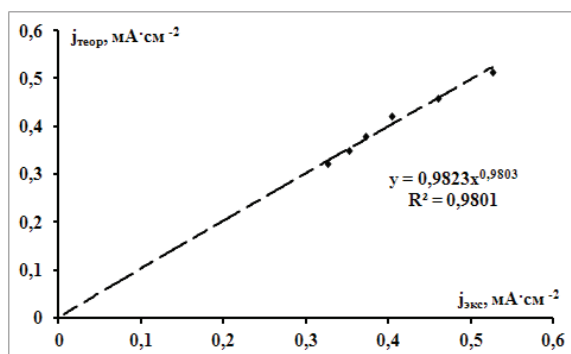


Рис. 13. $j_{\text{теор}} = f(j_{\text{эксп}})$ в системе Au|1 НАНО ИМ АТ S.aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ S.aureus в PBS при $E = 0,60$ В.

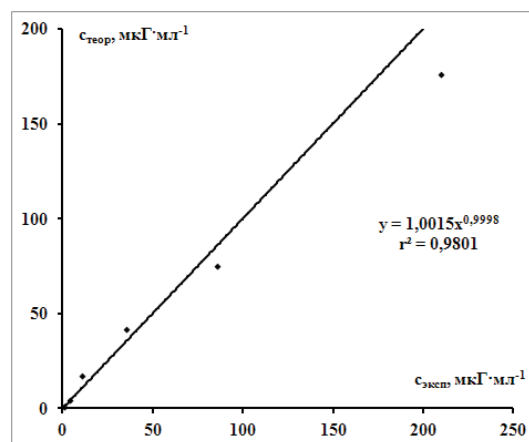


Рис. 14. $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{эксп}})$ в системе Au|1 НАНО ИМ АТ S.aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ S.aureus в PBS при $E = 0,60$ В.

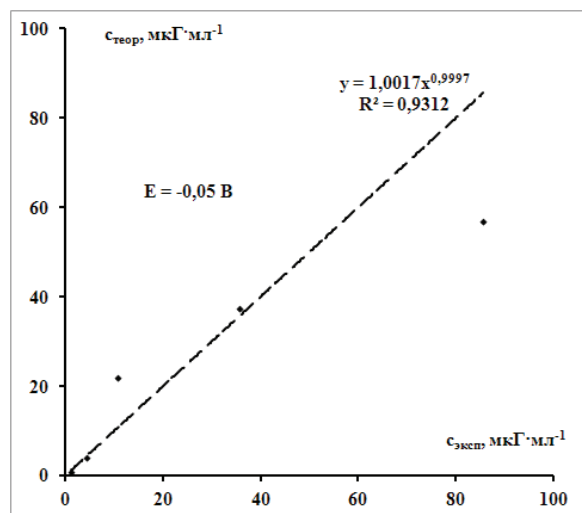


Рис. 15. $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{эксп}})$ в системе Au| 1 НАНО ИМ АГ St. aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ St. Aureus в PBS при $E = -0,05$ В.

Выяснено также, что ЦВАХ, снятые при наращивании концентрации исследуемого АГ или АТ через равные промежутки времени, позволяют построить весь спектр хроноамперограмм, реализуемый в диапазоне циклирования потенциалов, что существенно отличает этот метод от метода хроноамперометрии. Он позволяет быстро накапливать экспериментальные данные и быстро определять область среза ЦВАХ, где коэффициенты корреляции для зависимостей $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ использованных биосенсоров будут максимальными [3].

Для тестирования на уровень привитости населения к тем или иным микроорганизмам необходимо определение в пробе АТ к ним. На рис. 16 показаны ЦВАХ, полученные с помощью биосенсора, созданного для регистрации АТ S.aureus. Для этого на поверхности золотых и платиновых подложек создавали мономолекулярную распознающую фазу из АГ S.aureus. Имобилизацию АГ S.aureus производили по методике, описанной в работах [18–20].

Пропуская видоизмененные расчеты на рис. 17 и 18 приводим лишь конечные результаты построения $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ зависимостей из срезов катодной (0,20 В) и анодной (0,58 В) хроноамперограмм. Рассчитанные графики хорошо описываются степенными функциями, причем как показатель степени, так и предположительный множитель близки к 1. Коэффициенты корреляции r^2 для этих слу-

чаев соответственно равны 0,993 и 0,966. Это означает равенство между заданной экспериментальной и теоретической концентрациями АТ S.aureus. Таким образом, разработан биосенсор на АТ S.aureus, позволяющий определять уровень привитости населения к золотистому стафилококку.

Аналогичный биосенсор получен нами при использовании в качестве его подложки поликристаллической Pt (рис. 19).

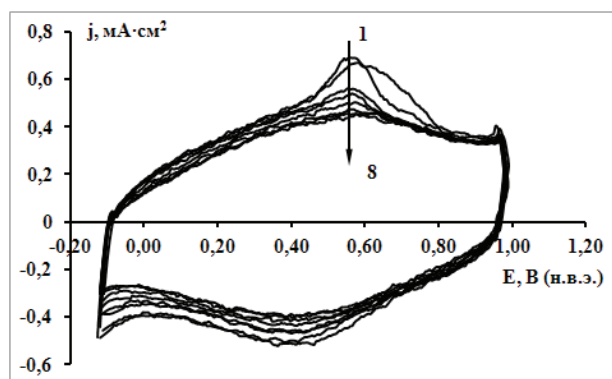


Рис. 16. ЦВАХ в системе Au| 1 НАНО ИМ АГ S.aureus | x мкг·мл⁻¹ АТ S.aureus в PBS. рабочий электрод – Au 00. $S = 0,903$ см². Крутизна 10 мА·В⁻¹. Скорость развёртки потенциала $s = 5$ В·с⁻¹. 1 – 0; 2 – 3,75; 3 – 16,2; 4 – 41,2; 5 – 103; 6 – 228; 7 – 478; 8 – 1100 мкг·мл⁻¹.

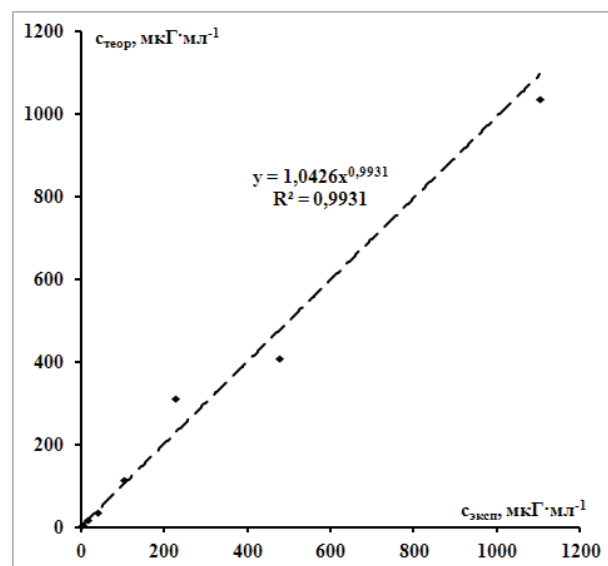


Рис. 17. $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ в системе Au| 1 НАНО ИМ АГ S.aureus| x мкг·мл⁻¹ АТ S. aureus в PBS при $E = 0,20$ В.

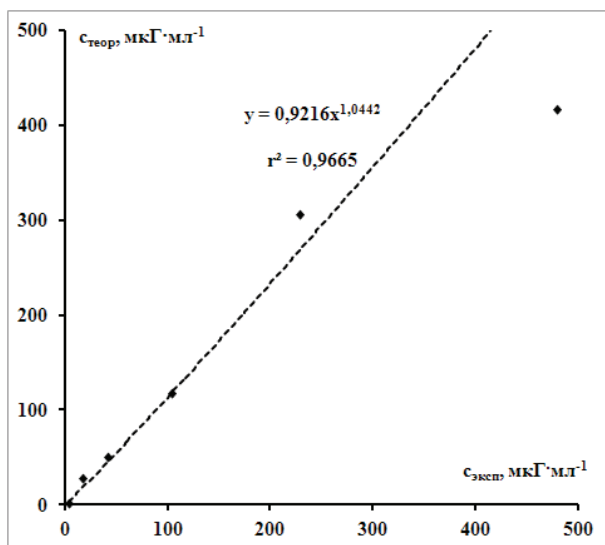


Рис. 18. $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ в системе Au|1 НАНО ИМ АГ St. aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ S. aureus в PBS при E = 0,58 В.

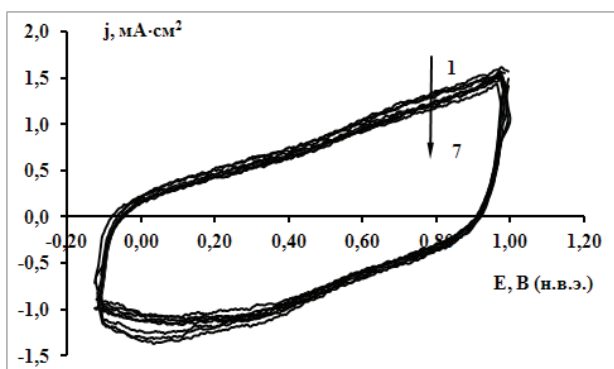


Рис. 19. ЦВАХ в системе Pt|1 НАНО ИМ АГ St. aureus | x мкг·мл⁻¹ АГ S.aureus в PBS. Рабочий электрод – Pt 00. S = 0.903 см². Крутизна 10 мА·В⁻¹. Скорость развёртки потенциала s = 5 В·с⁻¹.

В заключение данной работы приведём пример работы биосенсора на АГ S.aureus, который содержит в качестве распознающей фазы иммобилизованные антитела псевдо ФАТ S.aureus (система 11). На рис. 20 представлена $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ зависимость работы этого биосенсора в PBS. Аналогичные данные получены и для системы 10. Как следует из уравнения, приведенного на этом графике, величина концентрации АГ S.aureus, введённого в раствор PBS, определяется с высокой точностью. Такая точность определения АГ S.aureus не достигнута для наилучших коммерческих биосенсоров

выпускаемых промышленностью зарубежных стран.

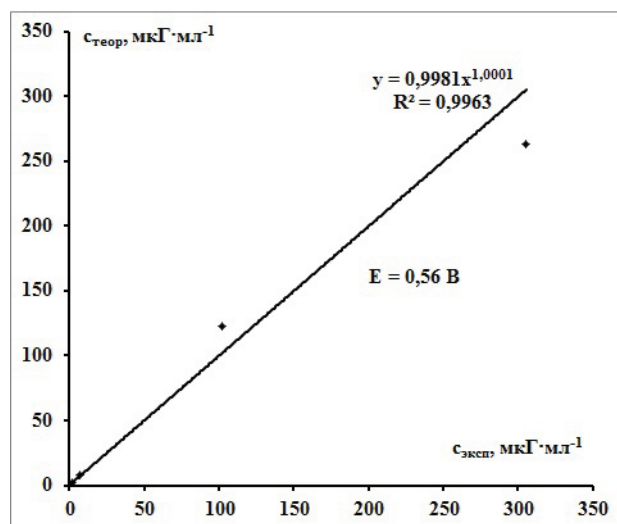


Рис. 20. $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ в системе Au|1 НАНО ИМ псевдо ФАТ S.aureus| x мкг·мл⁻¹ АГ S.aureus в PBS при E = 0,56 В.

Выводы

В данной работе описан разработанный нами метод количественного распознавания комплементарных антител и антигенов микроорганизмов с помощью высокоскоростной ЦВА. Измерения циклических вольтамперных характеристик осуществляли с помощью созданного компьютеризированного потенциодинамического комплекса. Разработанный метод позволил увеличить точность и воспроизводимость измерений. По сравнению с методами ИФА он дал возможность идентифицировать штаммы микроорганизмов за короткие промежутки времени, которые во многих случаях являются критическим параметром. В работе отработаны химические методы подготовки и очистки поверхности Pt и Au подложек от загрязнений, позволившие получать воспроизводимые циклические вольтамперные характеристики. Разработаны методы иммобилизации антител и антигенов к Pt и Au подложкам и решены вопросы создания мономолекулярных слоёв. Во всех исследованных системах коэффициент корреляции r^2 между $c_{\text{теор}}$ и $c_{\text{экс}}$ был больше 0,95, а в ряде случаев достигал 0,996.

Литература

1. Шульга А.А., Дзядевич С.В., Солдаткин А.П., Пацковский С.В., Стародуб Н.Ф., Стриха В.И., Ельская А.В., Тонкопленочные кондуктометрические энзимобиосенсоры для определения глюкозы и мочевины в крови // *Электрохимия*, - 1993.- В. 29,- с. 998.
2. Биосенсоры: основы и приложения. Пер. с англ. Под ред. Э. Тёрнера, И. Карубе, Дж. Уилсона. М.: Мир.- 1992.- 614 с.
3. Ковальчук Є.П., Остапович Б.Б., Турик З.Л., Блажейовський Є., Полімерні платформи для ензимних електродів // *Вістник ХНУ*.- 2005.- № 648.- С. 68 – 71.
4. Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій. За ред. Г.В. Єльської, В.Д. Походенка. Київ: Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,- 2006.- 408 с.
5. Методы измерения в электрохимии. Под ред. Э. Егера и А. Залкинд. Т. 1.- М.: Мир. 1977.- с.
6. Хейнеман У.Р., Селискар К.Дж., Ричардсон Дж.Т., Разработка новых тонкослойных спектроэлектрохимических сенсоров, избирательность которых реализуется тремя способами, и их применение // *Электрохимия*. - 2003.- Т.39.- В.8.- С. 982 – 993.
7. Выдра Ф., Штулик К., Юлакова Э., Инверсионная вольтамперометрия. Под ред. Б. Я Каплана.- М.: Мир. 1980.- с. 278.
8. Jelali V.V., Pochil S.I., Martinov A.V., Вольтамперометрический метод регистрации антигенов и антител микроорганизмов // *International Conference on Applied Physico - Inorganic Chemistry*. Sevastopol, Crimea, Ukraine, 2-7.10. 2011.
9. Gooding J.J., // *Electrochimica Acta*.- 2005.- V.59.- P. 3049.
10. Guang-Quan M., Jian-Shan Y., Wei-De Z., Unusual electrochemical response of ZnO nanowires-decorated multiwalled carbon nanotubes // *Electrochimica Acta*.- 2009.- V. 55. P. 511–515.
11. Ge Y., Huang C., Sen D., Yu H.Z., Electrochemical investigation of DNA-modified surfaces: From quantitation methods to experimental conditions // *J. Electroanal. Chem*.- 2007.- V. 602.- P. 156 – 162.
12. Безлепкина Е.Б., Касаткин Э.В., Цой В.С., Божко С.И., Исследование электросорбционных свойств монокристаллических платиновых электродов // *Электрохимия*.- 1987.- Т. 23,- № 10.- С. 1419-1426.
13. Левич В.Г., Физико-химическая гидродинамика.- М.: АН СССР.- 1952. с. 538.
14. Современные проблемы электрохимии. Перевод с англ. Под ред. Я.М. Колотыркина.- М.: Мир.- 1971.- с. 450.
15. Добош Д., Электрохимические константы.- М.: Мир.- 1980.- с. 366.
16. Графов Б.М., Укше Е.А., Электрохимические цепи переменного тока.- М.: Наука. 1973.- с. 129.
17. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М., Теория и практика иммуноферментного анализа.- М.: Высш. шк.- 1991.- с. 288.
18. Шеллер Ф., Кириштин Д., Шуберт Ф., Пфайффер Д., Мкнейл К., Ферменты в электрохимических биосенсорах. // *Электрохимия*.- 1993.- Т. 29.- В. 12.- С. 1522 – 1527.
19. Ковальчук Є.П., Яцишин М.М., Ковалишин Я.С., Речовина в інтерфазі. Фізична хімія тонких плівок.- Львів: ЛНУ.- 2005.- с. 225.
20. Джелали В.В., Современное состояние и перспективы развития электрохимических биосенсорных систем // *Вопросы химии и химической технологии*, 4 (1), 159 (2011).