На правах рукописи

Калмыкова Елена Николаевна

ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫЕ ИММУНОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

02 00 02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Воронеж – 2007

003162218

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Липецкий государственный технический университет"

Научный консультант — доктор химических наук, профессор Ермолаева Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор Дзантиев Борис Борисович

доктор химических наук, профессор Евтюгин Геннадий Артурович

доктор химических наук, профессор Шапошник Алексей Владимирович

Ведущая организация: химический факультет Московского государственного университета им М В. Ломоносова

Защита состоится 26 октября 2007 г в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212 038 19 по химическим наукам при Воронежском государственном университете (г Воронеж, Университетская пл , 1, химический факультет, ауд 439)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан _____ 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета М Ю Крысин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Необходимость разработки новых экспрессных высокочувствительных и селективных методов определения биологически активных веществ обусловлена их ролью в современном обществе С одной стороны, повсеместное использование пестицидов и лекарственных препаратов в сельском хозяйстве приводит к их накоплению в продуктах питания и объектах окружающей среды, что создает угрозу здоровью людей С другой стороны, при проведении медико-биологических исследований все более активно используются различные метаболитные биомаркеры, связанные с развитием инфекционных и соматических патологических процессов, выявление которых позволяет осуществлять диагностику заболеваний на ранних стадиях Актуальной проблемой в клиническом анализе остается необходимость обнаружения отдельных клеток и микроорганизмов В этой связи наряду с экспрессностью, высокой чувствительностью и селективностью определения одним из основных требований при выполнении большого числа рутинных анализов является простота, способствующая максимальному упрощению пробоподготовки Разработка таких методов должна быть основана на комплексном использовании достижений аналитической и биоорганической химии, медицины, электроники и физико-химических методов исследований

Одним из успешно развивающихся направлений является создание сенсоров различной природы, в том числе пьезокварцевых иммуносенсоров (ПКИ). Отличительной особенностью этого вида аналитических устройств является уникальное сочетание высокой чувствительности (детектирование на уровне микро- и нанограммов) и селективности определений, связанной с использованием иммунореагентов в качестве распознающих молекул, что

Сокращения, используемые в тексте: Аг – антиген, Ат – антитело, АПТЭС – γ-аминопропилтриэтоксисилан, АС - 4-аминосалициловая кислота, АФ – аминофенол, БАВ – биологически активные вещества, БСА – бычий сывороточный альбумин, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ГЖХ- газожидкостная хроматография, ГЖХ-МС – хромато-масс-спектрометрия, ГА – глутаровый альдегид, DЦК – N,N' – дициклогексилкарбодиимид, ЭДАК – 1 – этил – 3 – (3 – диметиламинопропилкарбодиимид), ИФА – иммуноферментный анализ, ИК – инфракрасная спектроскопия, k_o – константа скорости образования иммунного комплекса, k_p – константа скорости разрушения иммунного комплекса, $K_{АФ}$ – константа аффинности биорегентов, Кон А – конканавалин А, КОТ – котинин, КР – коэффициент кросс-реактивности иммунохимических реакций, ЛПС – липополисахарид, ЛК – липоевая кислота, m –масса, НФ – нонилфенол, N – число циклов измерений, О-ПС – О-специфический полисахарид, ОВА – овальбумин, ПКИ – пьезокварцевый иммуносенсор, ПИА - проточно-инжекционный анализ, ПФИА – поляризационный флуороиммуноанализ, РП – реакция преципитации, РА – реакция агглютинации, РПГА – реакция пассивной гемагглютинации, ФБФР – фосфатный буферный физиологический раствор, ПрО – предел обнаружения, СКВ – системная красная волчанка, С – концентрация, $C_{уд}$ – удельная сорбционная емкость, СМ – метод самособирающихся монослоев, S_m – массовая чувствительность определения, S-ПС – сульфатированный полисахарид, СТИ – соевый трипсиновый ингибитор, СКВ –системная красная волчанка, ТЕС – тетраэтоксисилан, F – частота колебаний пьезокварцевого сенсора, ЯМР – ядерный магнитный резонанс

позволяет осуществлять регистрацию биохимических взаимодействий без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных, радиоактивных, люминесцентных и др). Наиболее изучены иммуносенсоры, чувствительные к изменению массы, которые известны как микро- или нановесы Взаимодействие аналита с биочувствительным слоем приводит к изменению частоты, амплитуды и фазы колебаний пьезокварцевого преобразователя при изменении вязкости, плотности, упругости, проводимости и массы рецепторного слоя. Аналитическим сигналом ПКИ обычно служит уменьшение частоты колебаний сенсора, соответствующее увеличению массы рецепторного слоя при образовании на его поверхности иммунного комплекса

Пьезокварцевые сенсоры характеризуются простотой аппаратурного оформления, легкостью в эксплуатации, портативностью, возможностью включения в мультисенсорные системы, а также системы автоматического сбора и обработки информации По сравнению с иммунохимическими методами, используемыми при проведении клинических исследований, иммуносенсоры отличаются высокой экспрессностью и возможностью многоразового использования после регенерации биорецепторного слоя

Исследования, связанные с созданием ПКИ, вызывают неослабевающий интерес ученых практически во всех странах мира вот уже в течение более четверти века Многие публикации выявили привлекательные стороны этих аналитических устройств и перспективы их дальнейшего развития и практического применения Однако большинство работ носит разрозненный характер (посвящены созданию сенсоров для определения отдельных веществ, полученные данные нельзя распространить на определенный класс соединений) и ограничены модельными системами Кроме того, до настоящего времени отсутствуют систематические исследования, связанные с особенностями формирования биослоя сенсора с заданными свойствами, что сдерживает более активное внедрение ПКИ в практику биоаналитической химии Известные к настоящему времени способы формирования рецепторного покрытия пьезоиммуносенсора, определяющие чувствительность, селективность и продолжительность использования иммуносенсора, связаны с применением белков (антитела, гаптен-белковые конъюгаты), реже - ДНК, РНК и их фрагментов Расширение круга рецепторных молекул позволит развить новые подходы к получению биочувствительного слоя сенсора и унифицировать имеющиеся способы иммобилизации биомолекул с учетом цели проводимого иммуноанализа. Для выявления общих закономерностей и особенностей формирования биослоя с использованием различных по природе рецепторных молекул необходимо применение комбинированных приемов закрепления биомолекул на поверхности электрода ПКИ и проведение комплексных исследований с учетом физической и химической устойчивости, активности и массы иммобилизованных молекул

Разработка методик анализа с применением гравиметрических иммуносенсоров (тест-средства, детекторы для проточно-инжекционного анализа) для осуществления контроля объектов окружающей среды, пищевых продуктов, лекарственных препаратов и биологических жидкостей вызывает актив-

ный интерес исследователей практически во всех странах мира К сожалению, в нашей стране изучение работы массочувствительных иммуносенсоров практически не проводится

Цель исследования – развитие теоретических и методологических подходов к созданию экспрессных, высокочувствительных и селективных пьезокварцевых иммуносенсоров, предназначенных для определения биологически активных веществ и микроорганизмов в жидких средах в статических и проточных условиях

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

• изучить и теоретически обосновать новые способы формирования рецепторного слоя сенсора, обеспечивающие устойчивость, сохранение активности и направленную иммобилизацию биомолекул различных классов· антител, гаптен-белковых конъюгатов, ДНК, бактериальных О-антигенных липополисахаридов (ЛПС),

• определить закономерности протекания обратимых гетерогенных иммунохимических реакций для обоснования выбора иммунореагентов, состава регенерирующих растворов и прогнозирования чувствительности определения биологически активных веществ и микроорганизмов,

• установить зависимость величины аналитического сигнала пьезокварцевого иммуносенсора от условий выполнения анализа (состав, pH буферного раствора, скорость потока раствора или продолжительность экспонирования сенсора в анализируемом растворе, температура проведения реакции),

•выделить ЛПС и установить химическое строение О-специфических полисахаридов *Yersinia enterocolitica* серологических вариантов (сероваров) О 3, О 5, О 5,27 и О 6,31 для использования в качестве биораспознающих молекул сенсора,

•осуществить количественную оценку перекрестных специфических иммунохимических реакций иммобилизованных антигенов (гаптен-белковые конъюгаты, ЛПС, ДНК) с гомо- и гетерологичными антителами, а также антител с иммуногенами, гаптенами, их структурными аналогами и неспецифическими белками для характеристики селективности иммуносенсоров,

•разработать способы определения различных по природе и массе биологически активных веществ и микроорганизмов с применением ПКИ для анализа пищевых продуктов, объектов окружающей среды, биологических жидкостей.

Научная новизна

- Сформулированы теоретические положения и разработаны методологические приемы получения биорецепторного слоя сенсора, характеризующегося высокой устойчивостью, активностью и сохранением постоянной массы в течение 15-30 циклов измерений
- Развиты подходы к повышению чувствительности и селективности определения БАВ с использованием дифильных молекул ЛПС на основе регулирования ориентации антигенных детерминант биорецепторного слоя в зависимости от целей выполняемого анализа

- Установлена взаимосвязь кинетических характеристик обратимых гетерогенных иммунохимических реакций (k_o, k_p) и констант аффинности ($K_{АФ}$) биореагентов с оперативными характеристиками сенсоров Результаты использованы для прогнозирования чувствительности и экспрессности определения, а также для выбора регенерирующих растворов
- Выявлены доминирующие факторы, влияющие на чувствительность определения БАВ и микроорганизмов (состав, ионная сила, pH буферного и регенерирующего растворов, температура, продолжительность контактирования иммунореагентов) при регистрации гетерогенных биохимических реакций в водных средах
- Впервые установлены химические структуры О-ПС *Y enterocolitica* сероваров О 3, О·5, О 5,27 и О 6,31 для теоретического обоснования О-антигенной специфичности биорецепторных молекул ЛПС, необходимого при диагностической идентификации антител и серотипировании указанных бактерий
- Показана возможность использования коэффициентов кросс-реактивности (КР, %) иммунохимических реакций для характеристики селективности биослоя сенсора и оценки специфичности антител при диагностике иерсиниоза
- Разработан комплекс методик определения низкомолекулярных гаптенов, специфических антител и микроорганизмов в биологических жидкостях, пищевых продуктах, лекарственных препаратах и объектах окружающей среды в статических и проточных условиях с использованием ПКИ

Практическая значимость

- Разработаны и запатентованы способы формирования биорецепторного слоя ПКИ и способы определения сульфопрепаратов, нонилфенола и антител к бактериям *Y enterocolitica* с использованием ПКИ
- Предложены методические рекомендации по выбору способов иммобилизации биораспознающих молекул на гидрофильных и гидрофобных подложках (Кон А, S-ПС, силоксаны, липиды и ЛК), полученных с использованием самособирающихся монослоев, для направленной ориентации, сохранения активности и устойчивости биослоя при эксплуатации и длительном хранении
- Оптимизированы условия и предложен алгоритм проведения анализа жидкостей в статическом и проточно-инжекционном режимах с использованием ПКИ, включающий регистрацию аналитического сигнала сенсора и регенерацию биорецепторного покрытия
- Модифицирована установка для выполнения проточно-инжекционного анализа жидкостей и конструкция генератора колебаний сенсора, что позволяет в 3 –5 раз снизить расход иммунореагентов, в 3,5 раза – соотношение сигнал/шум по сравнению с аналогичными устройствами зарубежного промышленного производства
- Разработаны ПКИ и методики их использования в качестве тест-средств и детекторов для проточно-инжекционного определения низкомолекулярных

соединений лекарственных веществ токсикантов и метаболитов в пищевых продуктах, фармацевтических препаратах, биологических жидкостях и объектах окружающей среды

- Показана возможность использования ПКИ для клинической диагностики инфекционного иерсиниоза и некоторых аутоиммунных заболеваний В отличие от применяемых для этих целей микробиологических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов анализа, применение ПКИ позволяет сократить продолжительность единичного измерения от нескольких часов до нескольких минут
- Методики определения салициловой кислоты, сульфаниламидов, нонилфенола и котинина в жидких средах внедрены в лабораторный практикум спецкурса "Химические и биосенсоры"

На защиту выносятся:

- методологические приемы формирования биорецепторного покрытия сенсора с заданными свойствами с использованием различных способов иммобилизации антител, гаптен-белковых конъюгатов, ДНК и ЛПС (прямое закрепление на металлической поверхности электродов, ковалентная прививка к подложкам на основе Кон А, сульфатированного ПС, АПТЭС и ЛК с помощью бифункциональных реагентов, иммобилизация ЛПС с направленной ориентацией биомолекул,
- взаимосвязь состава, pH буферного и регенерирующего растворов, температуры, скорости раствора-носителя или времени контактирования иммунореагентов с величиной аналитического сигнала сенсора и оптимизация условий проведения анализа жидких сред с использованием ПКИ в качестве тест-средств и детекторов для проточно-инжекционного анализа;
- установление химической структуры бактериальных антигенов *Y enterocolitica* сероваров О 3, О 5, О.5,27 и О 6,31 и обоснование возможности использования в качестве биорецепторных молекул ПКИ,
- взаимосвязь констант скорости образования, разрушения и аффинности иммунных комплексов и коэффициентов кросс-реактивности исследованных иммунореагентов с чувствительностью и селективностью определений,
- комплекс методик с использованием ПКИ для определения гаптенов, антигенов и микроорганизмов в водных растворах и реальных объектах (вода, почва, пищевые продукты, лекарственные препараты, биологические жидкости – молоко, урина, сыворотка крови)

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на Международных и Российских конференциях. VII Всесоюзная конференция (Пущино, 1982), 3-rd Conference of young scientists (Czechoslovakia, 1984), VII Молодежная конференция по синтетическим и физиологически активным соединениям (Ереван, 1984), II Всесоюзная конференция "Иерсиниозы" (Ленинград, 1984), VII Всесоюзный съезд (Алма-Ата, 1985), I Всесоюзная научно-техническая конференция "Иерсиниозы" (Владивосток, 1986), XII-th International Symp On Carbohydrate Chem (USA, 1986); International Symp of Endotoxin (Japan, 1988), XIV International Carbohydr Symp (Japan, 1990), II

Всероссийская конференция "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" (Саратов, 1999), IV Региональная конференция "Проблемы региональной экологии" (Тамбов, 2000), VIII Региональная конференция "Проблемы химии и химтехнологии" (Воронеж, 2000), Всероссийская конференция "Химия и технология растительных веществ" (Сыктывкар, 2000), Всероссийский симпозиум "Тест-методы химического анализа" (Москва, 2001), International conference Biocatalysis–2002 Fundamentals & Applications (Moscow, 2002), III Съезд Биохимического Общества (Санкт-Петербург, 2002), Всероссийская конференция "Актуальные проблемы аналитической химии" (Москва, 2002); Международный форум "Аналитика и аналитики" (Воронеж, 2003); XIIV Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Казань, 2003), V Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды с международным участием "Экоаналитика – 2003" (Санкт-Петербург, 2003), I Региональная научная конференция "Химико–экологические проблемы Центрального региона России" (Орел, 2003), Всероссийская конференция по аналитической химии "Аналитика России" (Москва, 2004), II Международный симпозиум "Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии" (Краснодар, 2005), III Международная конференция "Экстракция органических соединений" (Воронеж, 2005), Областная научно-техническая конференция (Липецк, 2005), IV Всероссийская научная конференция "Химия и технология растительных веществ" (Сыктывкар, 2006), The International Congress On Analytical Sciences ICAS-2006 (Москва, 2006), Всероссийская конференция "Фагран" (Воронеж, 2006)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 64 печатные работы в виде 3 обзоров, 28 научных статей, из них 18 статей, входящих в список ВАК, материалов докладов и конференций, 4 патентов РФ и 1 монографии

Вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоял в разработке подходов к исследованию, постановке и решении основных задач, активном участии на всех этапах теоретических и экспериментальных исследований, интерпретации, анализе и систематизации полученных результатов

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 8 глав с изложением результатов работы и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 320 наименований, приложения Диссертация изложена на 310 страницах машинописного текста, включает 50 рисунков и 45 таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ Минобрнауки РФ· "Развитие научного потенциала высшей школы" (тема № 01970006723 "Проточные пьезокварцевые иммуносенсоры новые возможности для определения физиологически активных веществ"), темплана Минобрнауки РФ (тема "Физико-химические основы формирования и функционирования биосенсорных систем для определения физиологически активных веществ"), гранта администрации Липецкой области №А04-2 11-935 "Иммуносенсоры на основе пьезокварцевых преобразователей для определения вы-

соко- и низкомолекулярных биологически активных веществ в жидких средах"), гранта РФФИ №06-03-32226 "Создание новых высокочувствительных гравиметрических иммуносенсоров для ранней клинической диагностики инфекционных и аутоиммунных заболеваний" и регионального гранта РФФИ № 06-03-96339 "Новые методы определения биологически активных соединений, основанные на иммунохимических реакциях на поверхности пьезокварцевых сенсоров"

Автор выражает глубокую благодарность своему научному консультанту - зав. кафедрой химии ЛГТУ, проф., д.х.н. Татьяне Николаевне Ермолаевой за научные идеи, положенные в основу отдельных этапов работы, полезные советы, рекомендации и критические замечания, высказанные в ходе ее выполнения и обсуждения.

Глубокая признательность и благодарность моему первому учителю - академику РАН Юрию Семеновичу Оводову за возможность развития иммунохимических исследований в области бактериальных антигенов, неустанное внимание к работе и многолетнюю поддержку.

Автор выражает признательность и благодарность за всестороннюю помощь в выполнении работы сотрудникам кафедры химии ЛГТУ – к.х.н. Мелиховой Е.В., асс. Дергуновой Е.С., аспирантам Нартовой Ю.В., Шашкановой О.Ю; сотрудникам ЛГТУ - к.т.н. Милонову М.В., к.т.н Куликову А.И. и к.т.н., доц. Ширяеву В.Ю. Автор также искренне благодарит за сотрудничество в работе к.х.н. Горшкову Р.П., к.х.н. Командрову Н.А., к.х.н. Фролову Г.М., д.х.н. Исакова В.В. (ТИБОХ ДВО РАН) и д.х.н., проф. Еремина С.А. (МГУ им. М.В. Ломоносова) и зав. лабораторией особо опасных инфекций ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии Липецкой области"Зубову Н.Ю.

Выражаю благодарность за предоставленные биореагенты д.б.н., проф. Винтеру В.Г. (КГУ), д.м.н. Вертиеву Ю.В. (Институт микробиологии РАМН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения с использованием пьезокварцевого микровзвешивания выполняли на лабораторных установках, предназначенных для проведения статического и проточно-инжекционного анализа жидкостей В качестве датчиков применяли пьезокварцевые резонаторы АТ-среза (10 МГц±1 Гц) с электродами диаметром 5–8 мм, полученными магнетронным напылением серебра или золота (ЗАО "ЭТНА", Россия) Рассмотрены особенности конструкции лабораторных установок, предназначенных для проведения измерений в статическом и проточном режимах Дано описание основных узлов установки для проточно-инжекционного анализа, включающей генератор колебаний оригинальной конструкции на базе элементов транзисторно-транзисторной логики, микроячейку детектирования, обеспечивающую контакт одной стороны сенсора с анализируемым раствором, и др блоки

Приведены характеристики химических и биохимических реагентов, использованных для формирования биорецепторного слоя сенсора, а также определяемых веществ и микроорганизмов Выбор аналитов обусловлен значительными различиями их масс, широким распространением и разнообразием видов биологической активности (лекарственные вещества, экотоксиканты, маркерные метаболиты, бактериофаги и патогенные для человека бактерии *Y enterocolitica*)

Описаны условия выделения из микробной массы ЛПС, используемых в качестве биорецепторных молекул сенсора, и приведены методы установления химического строения О-ПС, включающие ацетилирование, восстановление, метанолиз, формолиз, метилирование, периодатное окисление, полный и частичный гидролиз, высоковольтный электрофорез, ионообменную хроматографию, гельфильтрацию, хроматографию на бумаге и в тонком слое, высоковольтный электрофорез на бумаге, ГЖХ, ГЖХ-МС, ^{13}С-ЯМР -и ИК-спектроскопию, оптическое вращение

Исследование особенностей иммунохимических взаимодействий с помощью ПКИ предполагает использование иммунореагентов (антигенов и гаптенов) с известным химическим строением Если строение использованных в работе синтетических гаптен-белковых конъюгатов включает информацию о белковой составляющей (БСА, СТИ, ОВА), природе линкера (диазо-, глутаровый альдегид) и гаптена, то для установления химического строения природных бактериальных О-антигенов грамотрицательных бактерий (О-ПС *Y enterocolitica*) необходима информация о моносахаридном составе, последовательности, типе и конфигурации гликозидных связей между остатками моносахаридов в повторяющемся звене полисахарида.

УСТАНОВЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ О-АНТИГЕНОВ *Y. enterocolitica* СЕРОВАРОВ О:3; О:5; О:5,27; О:6,31

При регистрации иммунных реакций с помощью пьезокварцевых детекторов предпочтительно в качестве иммобилизованных бактериальных О-антигенов использовать не микробные клетки, а их фрагменты - ЛПС, что позволит значительно уменьшить массу селектирующего слоя массочувствительного сенсора и расширить диапазон определяемых содержаний антител. Выбор бактерий указанных сероваров обусловлен их широким распространением в России. ЛПС выделяли экстракцией сухого ацетонового порошка микробов горячим водным фенолом с последующим удалением из водной фракции белков (обработка диэтиловым эфиром), низкомолекулярных веществ (диализ) и нуклеиновых кислот (ультрацентрифугирование). Выход очищенных лиофилизованных ЛПС составляет в среднем 1 %, примесь нуклеиновых кислот и белка не превышает 3 и 5% соответственно.

При мягком кислотном гидролизе ЛПС уксусной кислотой, последующем отделении осадка (липида А) и гельфильтрации углеводной компоненты на колонках с Сефадексом различных марок были выделены О-ПС, установление химической структуры которых осуществлялось методами полного и частичного кислотного гидролиза, периодатного окисления (распад по Смиту), метилирования с использованием ГЖХ, ГЖХ-МС, ^{13}С-ЯМР-спектроскопии образующихся фрагментов, моносахаридов и их производных (табл.1).

Таблица 1. Химическая структура О-ПС *Y. enterocolitica* различных сероваров

Серовар	Структура повторяющегося звена О-ПС
О:3	→ 2)-6d-L-Alt$_p$ (в 1 →
О:5; О:5,27	→ 3)-L-Rha$_p$ (в 1 → 3)-L-Rha$_p$ (б 1 → 3) -L-Rha$_p$ (б 1 → 2 2 ↑ ↑ в – D – Xlu$_f$ 2 в – D – Xlu$_f$ 2
О:6,31; О:6,30	→ 2)-D-Gal$_p$ (в 1 → 3) - 6d-D-Gul$_p$ (б 1 →

Моносахаридные остатки: **6d-L-Alt$_p$** - 6-дезокси-L-альтропираноза; **D -Xlu$_f$ - D ксилулоза (фуранозная форма); L-Rha$_p$ - L–рамнопираноза; D-Gal$_p$ – D**-галактопираноза; **6d-D-Gul$_p$** - 6-дезокси-D-гулопираноза.

Впервые в составе бактериальных полисахаридов были обнаружены и выделены в препаративных количествах редко встречающиеся в природе моносахариды: D-трео-пент-2-улоза (D - ксилулоза) и 6-дезокси-D-гулоза, идентификация которых, а также 6-дезокси-L-альтрозы, осуществлена с помощью ГЖХ, ГЖХ-МС, ^{13}С-ЯМР - спектроскопии и по величине удельного враще-

ния Отсутствие общих моносахаридных остатков в составе исследованных О-ПС указывает на правомерность отнесения бактерий к различным сероварам В то же время объединение микроорганизмов разных сероваров в одну группу (например, О 5 и О 5,27 или О 6,30 и О 6,31) может быть объяснено наличием в их составе одинаковых моносахаридов, связанных с общим фактором О.5 (D-ксилулоза и L-рамноза) или О 6 (D-галактоза и 6-дезокси-D-гулоза)

Таким образом, выделенные ЛПС с незначительным содержанием примесных компонентов могут использоваться в качестве биорецепторных молекул при разработке ПКИ для определения количества специфичных антител в сыворотке крови Установленные химические структуры О-ПС из ЛПС *Y enterocolitica* сероваров О 3, О 5, О 5,27 и О 6,31 служат теоретическим обоснованием иммунологической специфичности бактерий и более глубокого понимания механизмов иммунохимических реакций, что необходимо при диагностической идентификации антител у больных с подозрением на иерсиниоз и для серотипирования бактерий данного вида при осуществлении санитарно-гигиенического контроля

ФОРМИРОВАНИЕ БИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОКРЫТИЙ ЭЛЕКТРОДОВ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ РЕЗОНАТОРОВ

В зависимости от природы определяемых компонентов жидких сред (низко- или высокомолекулярные БАВ, микроорганизмы) необходимо оценить возможность использования различных биорецепторных молекул (гаптен-белковые конъюгаты, антитела, ДНК и ЛПС) Чувствительность, селективность и воспроизводимость детектирования определяемых компонентов жидких сред, а также продолжительность использования сенсоров существенно зависят от качества биорецепторного слоя К настоящему времени наиболее изучены методы иммобилизации белковых молекул (физическая, специфическая сорбция и хемосорбция рецепторных молекул на подложках с использованием кросс-линкеров) Большинство известных к настоящему времени способов формирования биослоя разработано для золотых электродов вследствие их химической устойчивости Однако в последнее время становятся привлекательными пьезокварцевые кристаллы с серебряными электродами в связи с их большей сорбционной эффективностью и относительно низкой стоимостью. Нами проведено комплексное исследование следующих способов получения биослоя на золотых и серебряных электродах

- непосредственное закрепление на металлической поверхности электрода ПКИ (физическая сорбция) антител различной специфичности, гаптен-белковых конъюгатов, ЛПС, ДНК,
- ковалентное присоединение биомолекул к подложкам, сформированным на основе гидрофильных и гидрофобных молекул (ТЭС, Кон А, S-ПС, АПТЭС и ЛК) золь-гель методом и методом самособирающихся монослоев с помощью бифункциональных реагентов и карбодиимидных производных (ГА, ДСК, ЭДАК и др),

•иммобилизация дифильных макромолекул ЛПС с регулируемым направлением антигенных детерминант

Применение метода пьезокварцевого микровзвешивания позволило контролировать каждую стадию приращения массы при поэтапном формировании биослоя Характеристики рецепторного покрытия оценивали по следующим параметрам массе подложки ($\Delta m_{пл}$, мкг), массе иммобилизованных на подложку (или непосредственно на электрод) биомолекул ($\Delta m_{мол}$, мкг), удельной сорбционной емкости подложки ($C_{уд} = \Delta m_{мол}/\Delta m_{пл}$), чувствительности определения массы ($S_m = \Delta F/m_{мол}$, Гц/мкг), стабильности покрытия (число циклов измерений (N) без снижения чувствительности биослоя сенсора), табл 2 Полученные результаты показали, что при выборе способа иммобилизации биомолекул необходимо учитывать природу металла электрода Так, для наиболее простого и быстрого закрепления белковых молекул с дисульфидными связями (антитела, гаптен-белковые конъюгаты) предпочтительно использование золотых электродов, поскольку иммобилизация осуществляется за счет образования координационных связей между атомами серы и золота При этом активность иммобилизованных белковых молекул (например, Ат к бактериям *Y enterocolitica*) характеризуется более высокими значениями S_m (1,9 Гц/мкг), чем при ковалентном присоединении биомолекул к подложкам на основе S-ПС, Кон А и АПТЭС (S_m соответствует 0,7 1,7 и 0,9 Гц/мкг) Это обусловлено достаточно мягкими условиями иммобилизации иммуноглобулинов Однако устойчивость пленочного покрытия невысока (2–4 измерительных цикла) Для молекул ДНК и ЛПС (содержание примесного белка не более 5%) прочного закрепления не происходит, уменьшение массы биослоя наблюдается уже в процессе промывания (серебряные электроды) или после 2–4 измерительных циклов (золотые), поэтому для иммобилизации небелковых молекул необходима активация металлической поверхности, которая позволяет получить значительно более устойчивые рецепторные слои

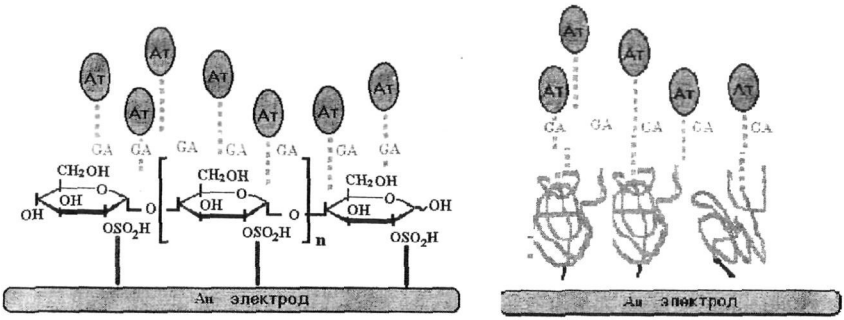
Ковалентные способы закрепления биомолекул более предпочтительны при формировании рецепторного слоя на основе гаптен-белковых конъюгатов Процедура формирования покрытия включает несколько стадий модификацию электрода веществами различной природы (силоксаны, липиды, ЛК, Кон-А, S-ПС), т е получение пленок, прочно связанных с металлической поверхностью, к которым далее биорецепторные молекулы прикрепляли с использованием карбодиимидных соединений или карбонилсодержащих бифункциональных реагентов (ДЦК, ЭДАК, ГА)

Установлено, что использование в качестве подложки сульфатированных ПС (содержащих не менее 24% сульфатных групп) по сравнению с Кон А, повышает устойчивость биослоя в 3–7 раз (табл 2, способы 6, 7 и 13, 14, рис 1) Более высокая адгезия полисахаридов связана с линейным строением макромолекул и, следовательно, с большей доступностью сульфатных групп по сравнению с белковыми молекулами (Ат, Кон А), у которых часть дисульфидных связей локализована внутри глобул

Таблица 2. Характеристики покрытий пьезокварцевых иммуносенсоров (n = 5; P=0,95)

№ спо-соба	Электрод	Подложка	$\Delta m_{пл}$, мкг	$\Delta m_{мол}$, мкг	$C_{уд}$, мкг/мкг	S_m, Гц/мкг	N
Сульфаметоксазол-белковые конъюгаты							
1	Au	Кон-А+ЭДАК	3,4	0,9	0,3	1,1	3
2	Au	Кон-А+ГА	8,6	4,6	0,5	2,6	6
3	Ag	Кон-А+ДЦК	22,7	6,9	0,3	6,4	6
4	Ag	АПТЭС+ГА	20,2	9,7	0,5	9,0	21
	Au	АПТЭС+ГА	6,5	6,0	0,9	18,3	36
5	Ag	ЛК+ЭДАК	31,9	12,0	0,4	9,2	12
	Au	ЛК+ЭДАК	4,7	3,9	0,6	4,7	9
Ацетохлор-белковые конъюгаты							
6	Au	Кон А+ГА	5,53	4,9	0,9	1,2	3
7	Au	S-ПС+ГА	23,8	7,1	0,3	14,5	21
Антитела к бактериофагам *Y. pestis*							
8	Au	Кон-А+ГА	22,1	17,4	0,8	1,1	2
9	Au	Кон-А+ДЦК	19,5	13,1	0,7	2,1	4
10	Ag	АПТЭС+ГА	17,8	45,4	2,6	1,1	8
11	Ag	АПТЭС+ЭДАК	19,3	38,1	2,0	0,6	6
Антитела к бактериям *Y. enterocolitica*							
12	Au	-	-	8,8		1,9	2
13	Au	S-ПС+ГА	20,0	7,5	0,4	0,7	28
14	Au	Кон-А+ГА	8,0	4,8	0,6	1,7	7
15	Au	АПТЭС+ГА	7,5	28,1	3,7	0,9	13
ЛПС							
16	Au	-	-	0,03	-	411	3-4
17	Au	липиды	0,16	0,13	0,81	351	24
18	Ag	липиды	0,18	0,12	0,93	487	26
19	Au	АПТЭС	0,14	0,11	0,86	237	23
20	Ag	АПТЭС	0,15	0,12	0,81	169	21
ДНК							
21	Ag	АПТЭС+ГА	7,1	26,4	3,7	5,5	20

Однако подложки на основе биополимеров не отличаются высокой сорбционной емкостью (для Кон А $C_{уд}$ изменяется в интервале 0,1 – 0,8; для S-ПС – не превышает 0,4) и не способствуют получению высоких аналитических сигналов сенсора. Для Кон А максимальные значения S_m составляют 6,4, а для полисахарида - 14,5 Гц/мкг.



а) б)

Рис. 1. Рецепторный слой на подложке биополимеров:
а - сульфатированный полисахарид, б – конканавалин А

Установленные характеристики демонстрируют более низкую эффективность по сравнению с покрытиями, полученными с использованием золь-гель метода и применением нанотехнологий СМ на основе низкомолекулярных веществ АПТЭС и ЛК (способы 4, 5, 10, 15; 21, рис. 2).

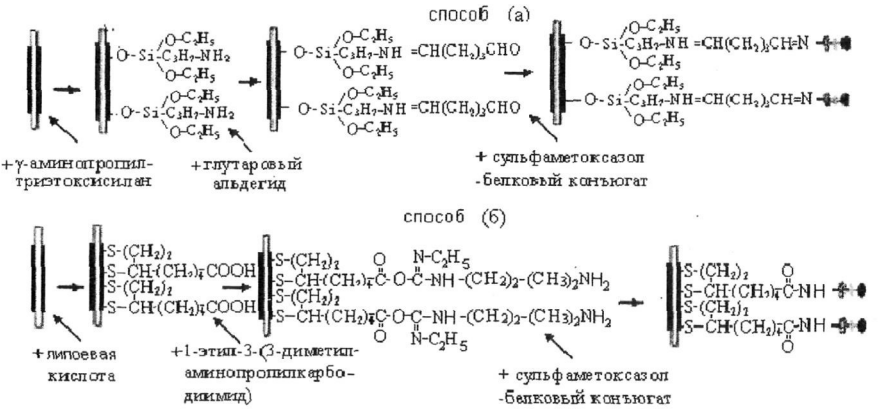


Рис. 2. Схемы иммобилизации гаптен-белковых конъюгатов на поверхности электрода сенсора с подложками на основе (а) – АПТЭС; (б) – ЛК

Формирование подложки методом самособирающихся монослоев обеспечивает получение однородных покрытий, более устойчивых к действию кислот и щелочей, используемых при реактивации биослоя сенсора (N составляет 6 – 9). При иммобилизации Ат к бактериям *Y. enterocolitica* (спо-

собы 12 – 15) наблюдается максимальное значение сорбционной емкости подложки для низкомолекулярного модификатора АПТЭС ($C_{уд}$ равно 3,8, что в 6 – 10 раз выше по сравнению с белком или полисахаридом) Причиной этого является способность низкомолекулярных соединений образовывать упорядоченные слои, которые характеризуются более высокой плотностью и концентрацией поверхностных функциональных групп, необходимых для последующего взаимодействия с кросс-реагентом и биомолекулами Следует отметить, что использование серебряных электродов позволило получить в некоторых случаях более устойчивые покрытия (способы 5, 10, 11, 18, табл 2), что может быть связано с высокой реакционной способностью серебра по сравнению с золотом

Установлено, что характеристика покрытия в значительной степени определяется также природой кросс-реагентов. Применение ГА является наиболее предпочтительным, поскольку способствует образованию гибких "мостиков" (за счет свободного вращения вдоль σ –связей), обеспечивающих конформационную подвижность биомолекул и более эффективное связывание с комплементарным аналитом (табл 2, способы 4, 5, 10, 15) Оптимальное сочетание чувствительности, стабильности, воспроизводимости сигнала сенсора проявляют покрытия, полученные на основе АПТЭС (4, 7, 10, 15), ТА (5) и ПС (7, 13) с последующим закреплением иммунореагентов с помощью ГА или ЭДАК Использование предложенных методов способствует повышению чувствительности определений и гидролитической устойчивости подложки, что делает возможным осуществление около 20 – 26 (Ag электрод) или 21 – 36 (Au электрод) определений на одном биорецепторном слое Иммуносенсоры могут сохраняться во влажной камере при $+4^0$С без снижения чувствительности свыше 3 месяцев Недостатком метода ковалентной иммобилизации является снижение активности антител (от 11 до 63 %), что может быть объяснено взаимодействием функциональных групп активных центров связывания с кросс-реагентами

Применение в качестве рецепторных молекул ЛПС, имеющих природную ковалентную связь между липидной и углеводной областями, позволяет не только исключить использование кросс-реагентов, что сокращает процедуру иммобилизации, но и предложить новые подходы формирования биослоя с управляемой ориентацией дифильных биомолекул (рис 3) Так, использование гидрофобного модификатора электрода при иммобилизации ЛПС (табл 2, способы 17, 18) приводит к взаимодействию липидной области макромолекулы с липидами покрытия и ориентации углеводных антигенных детерминант в сторону гидрофильного элюента. Это подтверждается эффективным взаимодействием ЛПС с гомологичными антителами и высокими значениями S_m (351 и 487 Гц/мкг для золотых и серебряных электродов соответственно) Гидрофильная подложка (табл 2, способы 19, 20) вызывает снижение величины S_m (237 и 169 Гц/мкг), что связано с противоположной ориентацией молекул ЛПС Предложенный способ получения рецепторного покрытия может быть использован при оценке эффективности противотоксичных лекарственных препаратов, взаимодействующих с липидной компо-

нентой микробных эндотоксинов. Предлагаемый подход к формированию биослоя сенсора на основе молекул ЛПС обеспечивает длительное сохранение активности биослоя (N =21 – 26) и направленную ориентацию распознающих сайтов.

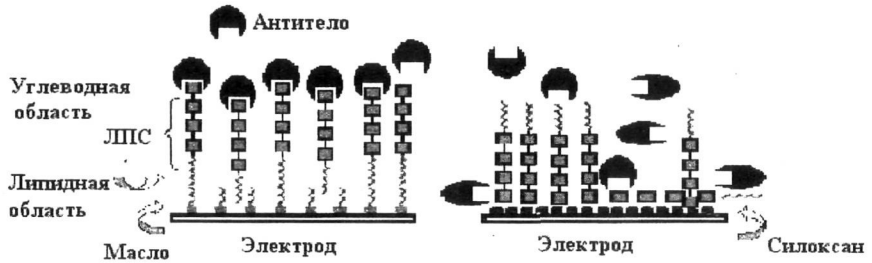


Рис. 3. Направленная иммобилизация ЛПС в зависимости от природы подложки

Таким образом, изучение различных методов иммобилизации антигенов, гаптенов и антител на поверхности золотых и серебряных электродов позволило выявить общие закономерности способов формирования биорецепторного слоя сенсора в зависимости от задач анализа. Комплексный подход к оценке биорецепторного слоя с учетом требований сохранения устойчивости, активности, пространственной доступности биомолекул и минимальной массы покрытия позволяет прогнозировать характеристики биослоя в зависимости от назначения иммуносенсора. Так, быстрое закрепление с максимальным сохранением активности белковых молекул (непосредственное нанесение на металлическую поверхность) может использоваться в исследовательских целях для получения сенсоров, от которых не требуется длительного срока эксплуатации. При ковалентной пришивке биомолекул к подложкам на основе сульфатированных ПС получаются наиболее устойчивые слои. Метод может быть рекомендован для проточного или проточно-инжекционного анализа, что повышает устойчивость при длительном контакте с жидкостью, обеспечивает более высокую воспроизводимость аналитического сигнала и сохраняет постоянную массу биослоя после регенерации. Однако при этом величина аналитического сигнала сенсора ниже, чем при использовании низкомолекулярных модификаторов электродов для получения подложек методом СМ. Несмотря на меньшую устойчивость по сравнению с полисахаридами, последние обеспечивают оптимальное сочетание высокой чувствительности и удовлетворительной стабильности работы сенсора при анализе жидких сред в условиях статического и проточного анализа. Использование дифильных молекул ЛПС позволяет получать биорецепторные слои с регулируемым направлением ориентации макромолекул в зависимости от целей выполняемого анализа (определение антител, взаимодействующих с углеводными антигенными детерминантами,

или полипептидных противотоксичных лекарственных препаратов, связывающихся с липидной областью ЛПС)

ПЬЕЗОКВАРЦЕВОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Известно, что чувствительность иммуноанализа в значительной степени зависит от химического сродства применяемых иммунореагентов В качестве критериев оценки аффинности взаимодействующих комплементарных пар использованы константы скорости прямой (k_o) и обратной иммунохимических реакций (k_p), протекающих на поверхности биорецепторного слоя сенсора, и константы равновесия, или константы аффинности ($К_{АФ}$), отражающие специфичность сродства биореагентов, установленные по методу Скетчарда Изучение гетерогенных иммунохимических реакций осуществляли в проточном режиме Для оценки связывания иммобилизованных антител исследовали суспензии микроорганизмов различных концентраций. Оценку связывания иммобилизованных антигенов (ЛПС, ДНК) и гаптенов осуществляли с использованием растворов соответствующих антител (табл 3)

Скорость взаимодействия биореагентов (k_o) определяет возможность получения быстрого аналитического отклика, что отражает не только природные особенности, но и состояние биореагентов после иммобилизации – активность, доступность поверхностных сайтов связывания, – а скорость разрушения образующегося иммунного комплекса (k_p) позволяет подбирать более мягко действующий состав регенерирующего раствора

Установлено, что при использовании гаптен-белковых конъюгатов скорость образования и прочность иммунного комплекса зависят не только от активности антител, но также от природы линкера и белковой составляющей конъюгата. Различия химического строения и конформационные особенности белковых молекул могут влиять как на иммуногенность конъюгатов, так и на пространственную доступность иммобилизованных иммунодетерминантных гаптенов при связывании с антителами Например, наибольшее сродство антител к аминосалициловой кислоте наблюдается при использовании гаптен-белкового коньюгата на основе БСА ($К_{АФ}$ равна 51,3 10^8 $М^{-1}$), что в 2 – 3 раза выше по сравнению с другими белками ОВА или СТИ, поэтому при разработке иммуносенсоров для определения салицилатов, сульфаметоксазола и фенольных производных использованы конъюгаты на основе БСА

Связывание ЛПС различных сероваров с гомологичными антибактериальными сыворотками характеризуется близкими значениями $К_{АФ}$ в диапазоне (1,2 – 6,3) 10^8 $М^{-1}$, что указывает на сходный характер взаимодействия этого класса антигенов с антителами и возможность применения любого из исследованных ЛПС при создании иммуносенсора. При этом для определения Ат 5-й серогруппы целесообразно формирование на основе ЛПС О 5,27 биослоя, имеющего более высокую k_p (5400 10^{-5} $с^{-1}$), что позволяет разрушить

Таблица 3. Эффективность аффинного взаимодействия антител с антигенами и гаптенами

Образцы антител	Антиген	$k_o \cdot 10^{-3}$, $M^{-1} \cdot c^{-1}$	$k_p \cdot 10^5$, c^{-1}	$K_{АФ} \cdot 10^{-8}$, M^{-1}	ПрО, нг/мл
Котинин					
ILS-106	КОТ – СТИ	15,1	1,8	8,2	-
ILS-983-6		26,3	9,9	2,7	-
ILS-985-7		17,7	1,10	16,0	400
4-Аминосалициловая кислота					
R1	4АС–БСА	174,5	3,4	51,3	300
	4АС–СТИ	34	2,3	14,7	400
	4АС–ОВА	82	3,3	24,8	-
Сульфаметоксазол					
R2	СФМ-Диазо-БСА	1,8	4,7	0,4	-
R3		56	3,7	15,1	0,2
4-Аминофенол					
Myg-3	4-АФ-ГА-BSA	11,7	3,9	3,0	1,0
Myg-2		37,7	2,4	15,6	-
Нонилфенол					
4H6	4-АФ-ГА-БСА	28,7	1,1	26,1	0,8
4H6	НФ-ОВА	291,7	0,3	972	0,5
Антитела к бактериям *Y. enterocolitica*					
O:3	ЛПС O:3	5600	2800	2,0	1300
O:5	O:5,27	3900	3100	1,3	1100
O:5,27	O:5,27	7000	5400	1,3	1100
O:6, 30	O:6,30	2200	3500	6,3	900
O:6, 31	O:6, 31	7700	6400	1,2	1500

иммунный комплекс не только KCNS, но и H_2O, обеспечивая более продолжительный срок эксплуатации сенсора (до 30 измерительных циклов).

Показано, что при разработке иммуносенсоров следует выбирать комплементарные пары с максимальным значением $K_{АФ}$. Так, например, для конъюгатов с котинином предпочтительно использование сыворотки ILS-985-7, содержащей наиболее активно взаимодействующие антитела ($K_{АФ}$ составляет $16{,}0 \cdot 10^8$ M^{-1}); для сульфаметоксазола и 4-аминофенола – сывороток R3 и Myg-2 – $K_{АФ}$ равна $15{,}1 \cdot 10^8$ и $15{,}6 \cdot 10^8$ M^{-1} соответственно. Применение иммунореагентов с более высокими значениями $K_{АФ}$ (10^8 – 10^9 M^{-1}л) при определении каждого из гаптенов (котинин, аминосалициловая кислота, сульфаметоксазол, нонилфенол), а также высокомолекулярных антител способствует повышению чувствительности сенсора (снижению предела обнаружения определяемого вещества), поэтому установленные значения $K_{АФ}$ могут рассматриваться не только в качестве параметра эффективности связывания комплементарных биомолекул, что отражает специфичность иммунных ре-

акций, но и для прогнозирования чувствительности определения БАВ внутри каждой группы

Таким образом, проведенные кинетические исследования гетерогенных иммунохимических реакций являются для создания ПКИ важным этапом, позволяющим не только осуществлять выбор иммунореагентов, но и прогнозировать экспрессность, чувствительность и специфичность определений, а также подбирать состав регенерирующего раствора для разрушения поверхностного иммунного комплекса Поскольку обычный диапазон изменения $K_{АФ}$ моно- и поликлональных антител, используемых в иммуноанализе, составляет $10^5 – 10^{11}$ M^{-1}, все исследованные иммунореагенты могут быть использованы для разработки сенсоров

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕКРЕСТНЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Поскольку перекрестные взаимодействия иммунореагентов могут быть причиной ложных положительных реакций, важно оценить их влияние на результаты определения Количественную оценку специфичности иммунореагентов проводили по величине коэффициентов кросс-реактивности (КР) с использованием уравнения $КР, \% = C_{50}(B)\ 100/C_{50}(A)$,

где $C_{50}(B)$ - концентрация 50%-ного связывания антител с определяемым антигеном (или гаптеном), характеризующимся структурным сходством или различием относительно иммуногена, $C_{50}(A)$ - концентрация 50%-ного связывания антител с собственным иммуногеном или гаптеном

Продемонстрирована возможность использования пьезокварцевых иммуносенсоров с иммобилизованными ЛПС *Y enterocolitica* сероваров О.3, О·5, О 5, 27, О·6,30 и О·6,31 для проведения количественной оценки перекрестного взаимодействия с поликлональными антителами, содержащимися в кроличьих и человеческих сыворотках крови Как было установлено ранее (табл 1), в составе О-специфических полисахаридов, отнесенных к различным серогруппам (3, 5 и 6), не содержится общих моносахаридных остатков и, следовательно, общих О-антигенных детерминант, что предполагает отсутствие между ними антигенного родства Однако для сероваров О 5 и О 5,27 отмечено наличие общего структурного фрагмента, связанного с фактором О 5 (пентасахаридное повторяющееся звено), что делает возможным проявление кросс-реактивности иммунореагентов Аналогичная закономерность отмечается для сероваров О 6,30 и О·6,31 На основании значений коэффициентов кросс-реактивности установлено присутствие антител, содержащихся в сыворотках крови, относящихся к определенному серовару или серогруппе бактерий (табл. 4) Так, сыворотки 81, 5483, 5485, 5499, одинаково активно связывающиеся с ЛПС О 3 (ПР 98 - 100 %), содержат специфичные антитела к бактериям О 3 Сыворотка 97 содержит антитела к бактериям О 5 или О 5,27, т к практически одинаково активно взаимодействует с ЛПС О 5 и О 5,27 (ПР 98 %) Аналогично сыворотки 102 и 597 содержат антитела к бактериям О 6 группы (96 – 98 %).

Таблица 4. Перекрестные взаимодействия (КР, %) ЛПС с сыворотками к бактериям *Y. enterocolitica*, исследованные с помощью РП и ПКИ (верхняя и нижняя строки соответственно)

ЛПС (штамм)	(КР, %) Ат								
	O:3 (81)	O:3 (5483)	O:3 (5485)	O:3 (5499)	O:5 (97)	O:5 (124)	O:5,27 (885)	O:6,30 (102)	O:6,31 (597)
O:3 (81)	+ 98	+ 100	+ 100	+ 100	— 4	— 4	— 6	— 8	— 6
O:5 (124)	— 6	— 5	— 4	— 4	+ 98	+ 98	+ 96	— 4	— 4
O:5,27 (885)	— 4	— 6	— 6	— 3	+ 98	+ 99	+ 97	— 6	— 6
O:6,30 (102)	— 4	— 4	— 4	— 4	— 7	— 9	— 9	+ 96	+ 96
O:6,31 (1477)	— 6	— 4	— 6	— 6	— 9	— 7	— 4	+ 97	+ 98

(+) – наличие полос преципитации; (—) – отсутствие полос преципитации

Высокочувствительные и селективные пьезокварцевые иммуносенсоры на основе иммобилизованных ЛПС могут использоваться при ранней клинической диагностике иерсиниоза, вызванного бактериями *Y. enterocolitica* всех исследованных сероваров, поскольку характеризуются высокой избирательностью взаимодействий. Исключение могут составлять ЛПС O:5 группы, для которых известна способность к перекрестному связыванию с антителами к *E. colli* O97, содержащими кетозу.

С помощью пьезокварцевого детектирования возможно выявление тонких различий в строении антигенных детерминант не только на уровне отдельных молекул, но также функциональных групп, входящих в состав близкородственных структурных аналогов гаптенов. Исследованы иммунохимические реакции поли- и моноклональных антител с производными салициловой кислоты, сульфаниламидами и фенолами (табл. 5).

При выполнении конкурентного формата иммуноанализа, наиболее часто используемого для определения низкомолекулярных веществ, конкуренция осуществляется между иммобилизованным и свободным гаптенами за связывание с антителами, вводимыми в анализируемую пробу. При этом можно проводить не только выбор антител для разработки иммуносенсоров (с учетом оценки их специфичности), но и прогнозировать возможность определения различающихся по химическому строению гаптенов.

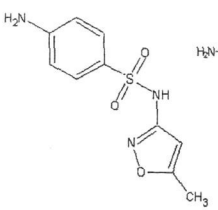
Значения кросс-реактивности гаптенов с моно- и поликлональными антителами демонстрируют максимальное сродство к собственному иммуногену (100 %), за исключением салициловой кислоты (170 %). Такой результат может быть проявлением более активного взаимодействия активного центра антител с молекулой из-за отсутствия стерических затруднений, вызванных

Таблица 5. Коэффициенты перекрестного взаимодействия антител со структурными аналогами гаптенов

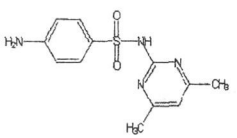
Гаптен	КР (%)		
	Антитела к 4-аминосалициловой кислоте		
4-Аминосалициловая кислота	100		
Салициловая кислота	170		
Ацетилсалициловая кислота	50		
	Антитела к сульфаметоксазолу		
	1	2	3
Сульфаметоксазол	100	100	100
Сульфаметоксазин	57	60	69
Сульфаметоксазина гемисукцинат	71	78	91
Стрептоцид	57	49	86
	Антитела		
	к 4-аминофенолу (поликлональные)	к нонилфенолу (моноклональные)	
Фенол	10	2	
Гидрохинон	49	2	
4-Аминофенол	100	3	
4-Нитрофенол	37	3	
Нонилфенол	64	100	
2,4-Динитрофенол	18	1	
2,4,6-Тринитрофенол	13	0,4	

аминогруппой. И, наоборот, присутствие в орто- положении более громоздкого ацетильного заместителя приводит к снижению эффективности связывания иммунореагентов (50 %). Поэтому сыворотка может использоваться для определения 4-аминосалициловой кислоты и всех исследованных веществ в анализируемой пробе.

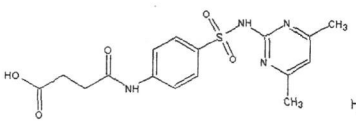
Антитела к сульфаметоксазолу, содержащиеся в сыворотках (1 – 3), проявляют максимальное сродство к собственному иммуногену (100 %), аффинность к аналогам (сульфаметазин, гемисукцинат сульфаметазина и стрептоцид) ниже (от 49 до 91 % в зависимости от конкретных комплементарных пар). Сыворотка 3 (табл. 5) содержит клоны антител не только к собственному иммуногену, но и к общему сульфаниламидному фрагменту, о чем



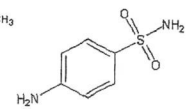
Сульфаметоксазол



Сульфаметазин



Сульфаметазина гемисукцинат



Стрептоцид

менту, о чем свидетельствует высокое значение КР (86 %). В сыворотках 1 и 2 в большей степени присутствуют антитела с активными центрами к иммунодоминантному пятичленному гетероциклическому заместителю при атоме азота в сульфамидной группе Поэтому эти сыворотки демонстрируют низкое сродство к стрептоциду (57 и 49 %) и сульфаметазину (57 и 60 %) Более высокая степень связывания антител с гемисукцинатом сульфаметазина объясняется присутствием в пара-положении пептидной связи (фрагмента, сходного с иммуногеном) Следовательно, сыворотка 3, проявляющая групповую специфичность, может быть использована для определения не только сульфаметоксазола, но и других сульфаниламидных лекарственных препаратов

При изучении взаимодействия поликлональных антител к 4-аминофенолу с различными производными фенола установлены высокие значения КР (от 100 до 49 %), в то время как для незамещенного фенола КР составляет лишь 10 % Это указывает на то, что иммунодоминантным структурным фрагментом гаптенов, связывающихся с поликлональными антителами к 4-аминофенолу, может выступать электронодонорный заместитель в молекуле фенола (амино-, нонил-, гидроксигруппы) В то же время наличие электроноакцепторных нитрогрупп вызывает снижение аффинности взаимодействия таких веществ с активными центрами антител, причем увеличение числа заместителей значительно снижает КР (от 37 % для моно- до 13 % для тринитрофенола) Моноклональные антитела к нонилфенолу характеризуются высокой специфичностью и практически не взаимодействуют с другими замещенными фенолами, для которых значения КР не превышают 5 %. Поэтому использование моноклональных антител целесообразно для высокоселективного определения нонилфенола, а поликлональных – для определения фенольных соединений с электронодонорными заместителями

Таким образом, пьезокварцевый детектор представляет собой удобный и высокочувствительный инструмент для изучения иммунохимических реакций, который позволяет количественно характеризовать специфичность иммунореагентов по значениям КР, что делает возможным прогнозировать селективность биосенсора, детерминировать круг возможных аналитов, определяемых с его использованием, а также проводить идентификацию специфичных антител, содержащихся в исследуемых сыворотках, что необходимо при клинической диагностике иерсиниоза

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АНАЛИЗА НА СИГНАЛ СЕНСОРА

Для оптимизации условий выполнения статического и проточно-инжекционного анализа с применением ПКИ изучены условия, способствующие наиболее полному протеканию иммунохимической реакции на поверхности биослоя сенсора и, следовательно, обеспечивающие максимальную величину его аналитического сигнала Исследовано влияние различных факторов состава и pH буферного раствора, температуры, соотношения и

времени контактирования иммунореагентов, которое в условиях проточного анализа определяется также скоростью потока исследуемой жидкости.

Обычно влияние состава и кислотности среды на чувствительность детектирования оценивают с использованием постоянной концентрации определяемого вещества и переменных значений pH. Нами применен такой подход для установления pH-оптимума для каждого конкретного гаптен-белкового конъюгата (рис. 4).

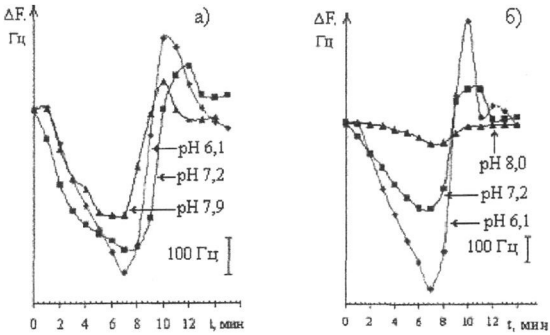


Рис. 4. Влияние pH буферных растворов- носителей на величину аналитического сигнала иммуносенсора при определении сульфаметоксазола (с = 10 нг/мл):
а - $NaOH – KH_2PO_4$,
б - $NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4$

Полученные результаты иллюстрируют, что эффективность биохимических реакций на поверхности ПКИ в значительной мере определяется концентрацией солей в растворе и pH среды, т.к. комплементарное связывание биореагентов зависит от пространственной доступности функциональных групп активного центра молекул иммуноглобулина и лиганда. Присутствующие ионы (H^+, K^+, Na^+, $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, Cl^-) изменяют конформационную подвижность функциональных групп, что приводит к увеличению или уменьшению сродства биореагентов.

При исследовании взаимодействия ЛПС О:3 с гомологичной сывороткой установлено, что pH оказывает влияние не только на величину аналитического сигнала сенсора, но и на линейный диапазон определяемых содержаний (рис. 5). Выбор диапазона варьирования pH осуществляли с учетом зна-

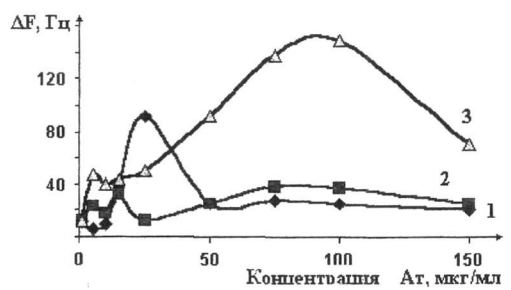


Рис. 5. Влияние pH раствора PBS на реакцию связывания ЛПС О:3 с Ат О:3:
1 - pH 5,8;
2 - pH 8,0;
3 - pH = 7,2

чений, близких к биологическим жидкостям человека (6,0–8,5), при которых иммунохимические реакции протекают наиболее активно. Полученные данные иллюстрируют, что выполнение анализа при pH 7,2 обеспечивает наиболее широкий линейный диапазон определяемых содержаний и максимальное значение аналитического сигнала.

Обратимый характер реакции образования иммунного комплекса предполагает возможность смещения равновесия в сторону обратной реакции при изменении ионного состава раствора. Установлено, что действие щелочных и кислотных растворов: 0,1 М HCOOH; 0,1 М NaOH; 3 – 8 М мочевина, вызывает разрушение не только иммунного комплекса, но и биослоя, включая подложку. При этом получаемое значение частотного сигнала сенсора превышает исходную величину. Применение мягко действующих реагентов: 0,01 mM – 0,04 mM водного раствора KCNS или дистиллированной воды – в отдельных случаях не способствует полной диссоциации комплекса, а значит эффективному удалению аналита, при этом частота колебаний сенсора находится ниже исходных значений. В большинстве случаев использование 0,4 mM KCNS обеспечивает полную диссоциацию иммунокомплекса и позволяет выполнять на одном покрытии иммуносенсора свыше 20 определений. При снижении активности биорецепторного слоя в ходе анализа для полной очистки поверхности электрода применяли 0,1 М раствор HCl (с = 1,198 г/см^3) или хлороформ. Сенсор с очищенным электродом использовали для получения биослоя на основе других биорецепторных молекул. При этом один пьезокварцевый резонатор с серебряными и золотыми электродами может использоваться до 5 и 10 раз соответственно.

Изменение температуры в диапазоне 18 – 26°С существенного влияния на величину аналитического сигнала ПКИ не оказывает, поэтому анализ может выполняться при комнатной температуре без термостатирования.

Независимо от природы определяемого компонента жидкости величина аналитического сигнала сенсора зависит от условий выполнения анализа. Поскольку лимитирующей стадией гетерогенной иммунохимической реакции является массоперенос реагирующих веществ в реакционную зону, изучено влияние скорости потока раствора при проточно-инжекционном анализе на величину аналитического сигнала (рис. 6).

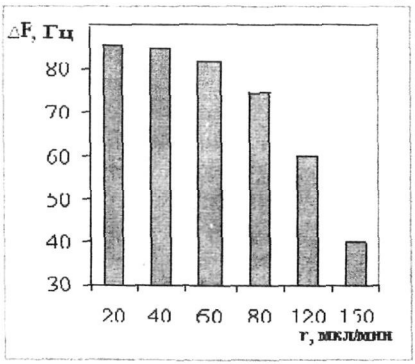


Рис. 6. Зависимость аналитического сигнала сенсора от скорости потока раствора (r) при взаимодействии сульфаметоксазол-белкового конъюгата со специфичными атителами (с = 40 нг/мл)

Увеличение скорости до 110 мкл/мин приводит к снижению аналитического сигнала, а уменьшение до 30 мкл/мин существенно замедляет процедуру измерения. Лучшие оперативные характеристики сенсора отмечаются при скорости раствора в диапазоне 50 – 70 мкл/мин. Повышение или снижение скорости сопровождается сужением диапазона определяемых концентраций или удлинением времени анализа.

Установлено, что при использовании иммуносенсоров в качестве тест-средств аналитический сигнал пропорционален продолжительности экспонирования модифицированного резонатора в анализируемом растворе. Оптимальное время контактирования реагентов составляет 30 мин и обеспечивает связывание молекул гаптена с максимальным числом активных центров антител.

Проведенные исследования в режиме реального времени позволили разработать алгоритм выполнения проточно-инжекционного анализа, средняя продолжительность которого не превышает 10 – 15 мин и включает следующие основные стадии (рис. 7):

- пропускание через ячейку детектирования буферного раствора носителя для стабилизации частоты колебания сенсора (F_m);
- ввод анализируемой пробы в поток буферного раствора-носителя, что сопровождается резким снижением частоты колебаний сенсора вследствие образования гетерогенного иммунокомплекса антиген-антитело в зависимости от концентрации аналита (5, 75, 100 мкг/мл);
- пропускание буферного раствора для стабилизации сигнала сенсора и регистрирование частоты колебаний сенсора; пропускание регенерирующего раствора для разрушения гетерогенного иммунокомплекса и восстановления первоначальной активности биорецепторного слоя;
- пропускание через ячейку детектирования буферного раствора до возвращения частоты колебаний сенсора к исходному значению (F_m).

Рис. 7. Изменение частоты колебаний сенсора в ходе цикла измерений при иммунохимическом взаимодействии аналита с биорецепторной молекулой

В результате проведенных исследований установлено, что на величину аналитического сигнала ПКИ оказывают влияние состав, pH буферного раствора и время контактирования иммунореагентов, которое в условиях проточного анализа определяется скоростью потока жидкости. При разработке ПКИ и выполнении анализа жидких сред с их использованием следует предварительно оптимизировать условия выполнения измерений с учетом вклада каждого из отмеченных факторов, уделяя особенное внимание выбору pH, что важно не только для получения максимального отклика сенсора, но и более широкого линейного диапазона определяемых содержаний целевого аналита.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И МИКРООРГАНИЗМОВ

Для характеристики диапазона возможностей пьезокварцевого детектирования представляло интерес определение компонентов жидкостей, значительно различающихся не только по биологической активности, но по размерам и, следовательно, по массам. Поскольку в настоящее время ПКИ применяются в статическом и проточном режимах, нами проведена сравнительная оценка обоих способов на примере определения салициловой кислоты и ее 4- и 5-аминопроизводных в жидкости (рис. 8, табл. 6).

Использование сенсора в статических условиях предусматривает измерение массы рецепторного слоя до и после его экспонирования в анализируемом растворе с последующим высушиванием. Долгое время считалось невозможным прямое детектирование низкомолекулярных гаптенов из-за не-

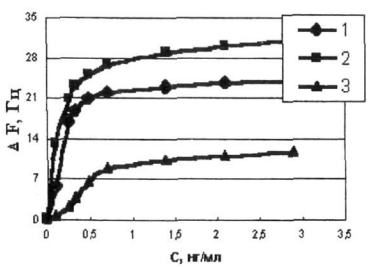


Рис. 8. Зависимость массы адсорбированных кислот от концентрации (С) в водном растворе:
1 – 4-аминосалициловая кислота,
2 – салициловая кислота,
3 – 5-аминосалициловая кислота

значительного приращения массы. Нами показано, что биослой с развитой поверхностью, полученный с использованием силоксановой подложки, позволяет определить салицилаты прямым способом. Полное насыщение активных центров связывания достигается при длительном экспонировании сенсора (20 мин) в анализируемом растворе. Для снижения влияния неспецифических взаимодействий использована система из двух пьезокварцевых сенсоров: индикаторного и сенсора сравнения, у которого предварительно заблокированы активные центры связывания.

Сходный характер кривых связывания и относительно близкие значения аналитических откликов сенсора свидетельствуют об антигенном родстве аналитов. Сенсор характеризуется групповой специфичностью и высокой чувствительностью (ПрО 0,08 нг/мл), линейный диапазон определяемых концентраций салициловой кислоты и ее аминопроизводных в указанных условиях соответствует 0,1 – 0,7 нг/мл.

Таким образом, разработанный иммуносенсор на основе поликлональных Ат характеризуется групповой специфичностью и может быть рекомендован в качестве тест-средства для прямого определения не только салициловой кислоты, но и ее аминопроизводных в водных растворах. Неоспоримая ценность применения сенсора в статических условиях состоит не только в достаточно низком пределе обнаружения, но и в возможности использования как в лабораторных, так и полевых условиях.

Более перспективно применение ПКИ в качестве детекторов в проточно-инжекционном анализе. В этих условиях для определения низкомолекулярных гаптенов использовали конкурентный формат анализа (табл. 6).

Таблица 6. Метрологические характеристики ПКИ (n=5, P=0,95)

Аналит	Способ выполнения, формат анализа	Линейный диапазон; (ПрО), нг/мл	s_r
Салициловая кислота	Статический, прямое определение	0,1 – 0,7; (0,08)	0,3
	ПИА, конкурентный	5000 – 25000; (400)	0,04
Котинин	ПИА, конкурентный	500 – 8000; (200)	0,01
Сульфаметоксазол	ПИА, конкурентный	5 – 100; (1,4)	0,1
Нонилфенол	ПИА, конкурентный	1 – 50; (0,8)	0,02

Характеристики разработанных сенсоров и методик определения низкомолекулярных веществ: лекарственных препаратов (салицилатов, сульфаниламидов), метаболитов (котинина), фенольного токсиканта (нонилфенола) – демонстрируют различный линейный диапазон в зависимости от определяемых соединений и активности используемых иммунореагентов, низкий ПрО определяемых гаптенов (200 – 0,15 нг/мл) и удовлетворительную воспроизводимость (0,01 – 0,3).

Разработанные пьезокварцевые иммуносенсоры апробированы при анализе реальных объектов: лекарственных препаратов, пищевых продуктов, биологических жидкостей (табл. 7).

Полученные результаты хорошо согласуются с данными альтернативных методов анализа: ПФИА и ВЭЖХ. Применение теста Стьюдента показало отсутствие систематических погрешностей, что подтверждает правильность разработанных методик с применением ПКИ.

Таблица 7. Определение низкомолекулярных биологически активных веществ с применением ПКИ детекторов ПИА (n=5, P=0,95)

Анализируемая проба	Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Рассчитано (нг/мл)	s_r
Салициловая кислота (метод градуировочного графика)				
Салициловый спирт	8000	6000±200	-	0,03
	23000	22500±200	-	0,01
Сульфаметоксазол (метод градуировочного графика)				
Бисептол (Польша)	20,0	16,3±0,8	-	0,04
Котримаксазол (Россия)	20,0	17,8±1,5	-	0,1
Сульфаметоксазол (метод стандартных добавок)				
Вода р. Воронеж	10,0	13,6±0,6	3,6±0,6	0,2
Почва (птицефабрика)	10,0	22,3±2,9	12,3±2,9	0,2
Молоко женское	10,0	14,8±0,9	4,8±0,9	0,06
Молоко коровье цельное	10,0	11,5±0,4	1,5±0,4	0,04
Молоко пастеризованное	10,0	10,6±0,2	0,6±0,2	0,02
Куриное мясо	10,0	13,9±0,6	1,6±0,6	0,1
Куриные яйца	10,0	11,6±0,4	0,8±0,4	0,1
Нонилфенол (метод градуировочного графика)				
Вода р. Воронеж	-	15,2±0,6	-	0,02
Котинин (метод градуировочного графика)				
Урина - проба 1	-	2300±300	-	0,04
Урина - проба 2	-	4500±500	-	0,05

Преимуществом предлагаемого способа анализа по сравнению с ВЭЖХ, является возможность определения более низких концентраций (например, сульфопрепаратов в 200 раз).

Широкое применение противомикробных лекарственных препаратов в сельском хозяйстве (в том числе сульфаниламидных) привело к тому, что они стали такими же распространенными, как пестициды. Накапливаясь в продуктах питания, сульфаниламиды и их метаболиты представляют угрозу здоровью людей. Кроме того, поступление антибиотиков в окружающую среду приводит к повышению устойчивости бактерий к действию лекарств, что уменьшает перечень антибактериальных веществ, с помощью которых осуществляется борьба с инфекциями. Установленные концентрации салициловой кислоты и сульфаметоксазола в отечественных и импортных лекарственных препаратах соответствуют прилагаемым к лекарственным формам документам, что подтверждает удовлетворительное качество сертифицированной фармацевтической продукции. Сульфаметоксазол обнаружен в молоке женщины при приеме сульфопрепаратов, а также во всех образцах коровьего молока (от 0,6 до 1,5 нг/мл), курином мясе (1,6 нг/г) и яйцах (0,8 – 1,2 нг/г), что значительно ниже нормируемых показателей для стран Европейского союза (100 нг/мл).

Нонилфенол, используемый при производстве моющих средств, краси-

телей, антиоксидантов, гербицидов и дубильных веществ, характеризуется токсичными свойствами, подобно другим фенольным производным Поэтому необходим контроль за содержанием этих соединений в объектах окружающей среды и пищевых продуктах

В образцах воды р Воронеж обнаружены сульфаметоксазол (13,6±0,6 нг/мл) и нонилфенол (15,2±0,6 нг/мл), попадающие со сточными водами промышленных предприятий, уровень сульфаметоксазола в почвенных пробах птицефабрики несколько выше (22,3±2,9 нг/мл), однако содержание этих веществ не превышает утвержденных норм

Определение котинина (метаболита никотина) проводилось с целью выявления активных курильщиков при проведении социологических исследований Проанализированные методом стандартных добавок образцы урины позволили дифференцировать пассивных и активных курильщиков по содержанию котинина на уровне 800 – 1000 и 1200 – 8000 нг/мл соответственно, что согласуется с результатами аналогичных исследований, выполненных с применением ПФИА

Таким образом, разработанные сенсоры и методики статического и проточно-инжекционного определения низкомолекулярных БАВ с их использованием характеризуются достаточно широким диапазоном определяемых содержаний и низким пределом обнаружения Практическое применение иммуносенсоров позволяет с высокой чувствительностью и селективностью выявлять превышение допустимого содержания токсичных или лекарственных веществ в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, а также осуществлять контроль за соответствием качества лекарственных препаратов заявленным на упаковке характеристикам

РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА АУТОИММУННЫХ И ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЬЕЗОКВАРЦЕВОГО ИММУНОСЕНСОРА

Определение бактерий. Выбор определяемого объекта исследования - бактерий *Y enterocolitica* (“бактерии из холодильника”) обусловлен тем, что они являются возбудителями инфекционного кишечного заболевания – иерсиниоза, занимающего значительное место в патологии человека и животных Факторами передачи инфекции являются грязные руки и зараженные продукты питания, хранящиеся при низких температурах В этих условиях указанные микроорганизмы в отличие от других бактерий не только сохраняют свою жизнеспособность, но и очень хорошо размножаются, что объясняет причину возникновения эпидемиологических вспышек иерсиниоза после употребления в пищу термически необработанных продуктов питания, долгое время хранившихся в холодильниках или овощехранилищах, а также ранней овощной продукции – редиса, лука, салата и т.д

Число заболеваний иерсиниозом прогрессирует во всем мире, наибольшее значение в патологии человека имеют серовары О 3, О·5, О 6, О 8 и О 9

С целью повышения экспрессности определения бактерий в водных растворах нами исследована возможность использования ПКИ на основе иммобилизованных моноклональных антител к бактериям *Y. enterocolitica* O:3 серовара. Определение высокомолекулярных аналитов: антител и микроорганизмов, – осуществляли в прямом формате по приращению массы биослоя в процессе взаимодействия рецепторных молекул сенсора с целевыми компонентами анализируемых жидкостей.

Для установления линейного диапазона и предела обнаружения бактерий были использованы образцы суспензий с различной концентрацией микроорганизмов, которые получали разбавлением прогретой стандартной взвеси, приготовленной по стандарту мутности и содержащей $1 \cdot 10^9$ клеток/мл. Показано, что способ получения биослоя сенсора оказывает влияние на метрологические характеристики иммуносенсора (табл. 8).

Таблица 8. Метрологические характеристики иммуносенсоров

Подложка	Способ иммобилизации	Линейный диапазон, 10^{-4} клеток/мл	Параметры уравнения градуировочной функции	ПрО, 10^{-4} клеток/мл
S-ПС	2-3	0,06-0,6	$\Delta F=39,2c+3,6$; $R^2 = 0,95$	0,02
Кон-А	3	0,1-0,6	$\Delta F=9,8\ c+6,4$; $R^2 = 0,95$	0,10
APTES	4	0,3-4,9	$\Delta F=2,1c+13,8$; $R^2 = 0,97$	0,10

Так, использование полисахаридной подложки способствует повышению воспроизводимости аналитического сигнала, снижению предела обнаружения до $0,02 \cdot 10^4$ клеток/мл (ПС-3) и незначительному расширению линейного диапазона по сравнению с Кон А. Узкий линейный диапазон определяемых концентраций микроорганизмов установлен для всех сенсоров, что может быть связано с природой бактерий *Y. enterocolitica,* размером, возможным присутствием в пробе R-форм клеток, лишенных О-специфических полисахаридов. Для практического применения предложен сенсор на основе АПТЭС, для которого отмечен наиболее широкий линейный диапазон определяемых содержаний (0,3 – 4,9), хорошая воспроизводимость определений (0,04) и достаточно низкий предел обнаружения ($0,1 \cdot 10^4$ клеток/мл).

Правильность разработанной методики определения бактерий оценивали методом "введено-найдено" (табл. 9), проверка результатов по критерию Стьюдента не выявила систематической погрешности.

Методика определения микроорганизмов апробирована при анализе реальных образцов: питьевой воды и пищевых продуктов (табл. 10).

Таблица 9. Проверка правильности определения бактерий *Y. enterocolitica* серовара 0:3 методом "введено-найдено" (P=0,95; n=5)

Введено, 10^{-4} клеток/мл	Найдено, 10^{-4} клеток/мл	s_r
0,30	0,31±0,03	0,04
0,60	0,63±0,03	0,02
4,90	4,80±0,22	0,03

Таблица 10. Определение бактерий *Y. enterocolitica* серовара O:3 в образцах пищевых продуктов методом добавок (P=0,95; n=5)

Анализируемый продукт	$C_{доб}$, 10^{-4} кл/мл	$C_{х+доб}$, 10^{-4} кл/мл	Процент открытия
Питьевая вода	0,6	0,58±0,01	97
Молоко	0,6	0,61±0,04	102
Лук	0,6	0,59±0,03	98
Яблоки	0,6	0,59±0,02	98
Бананы	0,6	0,60±0,03	100

Приведенные данные позволяют констатировать, что в пределах ошибки опыта во всех проанализированных образцах отсутствуют патогенные микроорганизмы *Y. enterocolitica* серовара O:3, что подтверждено результатами бактериологического анализа. Разработанная методика проточно-инжекционного определения бактерий с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров характеризуется экспрессностью (единичное измерение не превышает 10 мин в отличие от серологических и бактериологических методов продолжительностью несколько часов или суток), высокой чувствительностью, селективностью и не требует сложной пробоподготовки.

Применение ПКИ на основе иммобилизованных антител перспективно для использования при оценке качества питьевой воды, продуктов питания и различных видов биологического материала для определения бактерий *Y. enterocolitica*, что особенно важно при проведении санитарно-гигиенических мероприятий в очагах распространения кишечной инфекции и при осуществлении контроля предприятий общественного питания с целью выявления и профилактики иерсиниоза.

Определение бактериофагов. Фаготипирование является в настоящее время одним из методов диагностики иерсиниозной инфекции, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы одного и того же вида бактерий. Являясь паразитами бактерий, бактериофаги применяются также при проведении генетических исследований и создании противомикробных препаратов и т.п. В этой связи представляла интерес возможность применения ПКИ для определения этого класса микроорганизмов в водных средах. При исследовании были использованы противочумные бактериофаги, относящиеся к роду *Yersinia*. Учитывалось

также, что при реальной угрозе биотерроризма чумной микроб представляет собой один из важнейших биологических патогенных возбудителей, для идентификации которого требуется разработка новых приемов диагностики.

Разработан способ высокоселективного проточно-инжекционного определения бактериофагов в водных растворах с использованием ПКИ, что подтверждено отсутствием взаимодействия иммобилизованных специфичных антител к бактериям *Y. pestis* со стафилококковыми бактериофагами и бактериальными О-антигенами *Y. enterocolitica* исследованных сероваров.

Градуировочная функция ($y = 3000x + 39$; $R^2 = 0,97$) линейна в более широком интервале концентраций $(0,2 – 1)\cdot10^5$ фагов/мл по сравнению с бактериями, что коррелирует с размерами определяемых частиц. Сенсор апробирован при определении фагов в модельных растворах (табл. 11). ПрО составляет $0,05\cdot10^5$ фагов/мл. Проверка правильности определения бактериофагов методом "введено-найдено" не выявила систематической погрешности. Способ характеризуется высокой воспроизводимостью, чувствительностью, экспрессностью и может применяться для анализа водных сред.

Таблица 11. Метрологические характеристики методики определения бактериофагов с помощью пьезокварцевого иммуносенсора (P=0,95; n=5)

Введено, 10^5 фагов/мл	Найдено, 10^5 фагов/мл	s_r
0,30	0,31 ± 0,01	0,01
0,60	0,59 ± 0,02	0,02
0,90	0,91 ± 0,02	0,02

Таким образом, полученные данные демонстрируют возможность высокочувствительного и селективного определения микроорганизмов, значительно различающихся по величине и массе, однако при этом следует учитывать, что увеличение размера анализируемых объектов приводит к сужению линейный функции градуировочного графика сенсора.

Определение антител. Присутствие в крови Ат различной специфичности может служить маркером для выявления различных соматических и инфекционных заболеваний как острых, так и хронических форм.

Необходимость определения Ат к бактериям *Y. enterocolitica* обусловлена полиморфизмом клинических проявлений иерсиниоза (артритная, кишечная, миокардитная и др. формы), что затрудняет диагностику заболевания, поэтому ранние лабораторные исследования играют решающую роль в постановке правильного диагноза, проведении эффективного лечения и предотвращении эпидемических вспышек.

Разработаны и предложены сенсоры на основе ЛПС О:3; О:5 или О:6 серогрупп для определения антител в сыворотках крови. Все сенсоры характеризуются близкими значениями линейного диапазона определяемых концентраций антител в интервале 2 – 100 (110) мкг/мл, что отражает использование в качестве рецепторных молекул биополимеров, относящихся к одному классу. Образцы растворов антител серовара О:3 готовили на основе точной навески стандартной диагностической сыворотки с титром активности 1:6400

из набора сухого эритроцитарного РПГА-диагностикума растворением в буферном растворе (диапазон концентраций 1–150 мкг/мл), рис. 9.

Рис. 9. Градуировочный график сенсора с рецепторным слоем на основе иммобилизованных ЛПС

Линейный диапазон определяемых концентраций составляет 3 – 110 мкг/мл, ПрО – 1,3 мкг/мл, s_r = 0,08.

Оценка правильности определения Ат осуществлена методом "введено-найдено" и сопоставлением полученных результатов с данными РПГА (табл. 12). Модельные растворы готовили в соответствии с методикой проведения РПГА путем последовательного разведения исходной сыворотки.

Таблица 12. Оценка правильности определения антител *Y. enterocolitica* O:3 (титр активности сыворотки 1:6400) в образцах растворов (P=0,95; n=5)

Номер пробы	Введено антител		Найдено антител, мкг/мл	% открыпия
	разведение сыворотки	мкг/мл		
1	1:100	426	90±0,6	21
2	1:200	213	87±0,6	41
3	1:400	106,5	100±0,8	94
4	1:800	58,3	57±0,7	98
5	1:1600	26,2	25±0,6	95
6	1:3200	13,1	13±0,4	99
7	1:6400	6,6	7±0,4	106
8	1:12800	3,3	3±0,5	91
9	1:25600	1,7	1,5±0,3	88

В табл. 12 для характеристики анализируемых проб наряду с концентрациями Ат, введенных в пробу, приведена величина разведения сыворотки, традиционно используемая при выявлении иерсиниоза с помощью РПГА. Как видно из полученных данных, чувствительность ПКИ в 4 раза выше по сравнению с РПГА, поскольку позволяет регистрировать присутствие антител на уровне, соответствующем титру активности 1:25600. Результаты анализа сывороток с разведением от 1:25600 до 1:400 не содержат систематической погрешности и позволяют осуществлять регистрацию более низких концентра-

ций Ат с хорошим % открытия, который в пределах градуировочного графика составляет 94 – 106.

Исследование образцов сыворотки крови. Иммуносенсоры с иммобилизованными ЛПС О:3 апробированы при анализе более 40 сывороток крови, полученных от здоровых людей, а также от больных иерсиниозом, что подтверждено результатами лабораторного анализа методом РПГА. Установленные с помощью пьезоиммуносенсора концентрации Ат хорошо согласуются с результатами РПГА, (рис. 10).

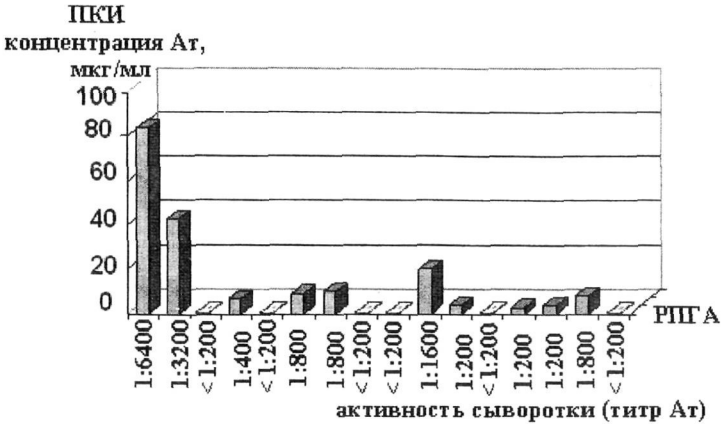


Рис. 10. Определение Ат в сыворотках крови с помощью ПКИ

Поскольку положительным результатом считается титр антител 1:200, у инфицированных пациентов содержание Ат находится в интервале от 3,1 до 43,1 мкг/мл. В крови здоровых людей обнаружены Ат в следовых концентрациях (< 1,6 мкг/мл), практически на уровне предела обнаружения пьезокварцевого иммуносенсора. Следовательно, ПКИ может быть использован для экспрессного прямого количественного определения Ат с более высокой чувствительностью по сравнению с РПГА, что может быть полезно как для выявления иерсиниоза на ранних стадиях, так и при осуществления контроля за эффективностью лечения.

Таким образом, предложенный на основе ЛПС сенсор, отличающийся более высокой экспрессностью, чувствительностью и экономичностью (возможность многоразового использования), перспективен для определения антител в сыворотках крови при диагностике иерсиниоза на ранних стадиях.

Как уже отмечалось выше, одной из клинических форм иерсиниоза является артритная, при этом известны случаи выделения у больных с ревматоидным артритом антител к бактериям *Y. enterocolitica* серовара О:5. Однако более часто проявление артритной патологии служит указанием на развитие аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанки (СКВ), ревматоидного артрита, хронического гломерулонефрита и др., при которых в организме образуются антитела к собственным ДНК. Нами предложены иммуносен-

соры на основе молекул ДНК для определения антител к ДНК в сыворотках крови и методика выполнения анализа, предусматривающая исследование предварительно разбавленных растворов. Сенсоры апробированы при указанных аутоиммунных патологиях, некоторые из них приведены в табл. 13. Полученные результаты хорошо согласуются с данными ИФА.

Рецепторный слой сенсора получен на основе молекул ДНК, в качестве стандартного раствора Ат применена сыворотка больного с симптомами СКВ, активность которой по результатам ИФА соответствует 320 МЕ, линейный диапазон определений с использованием иммуносенсора составляет 0,1 – 25 мкг/мл, (0,03 – 8 МЕ), ПрО – 0,01 мкг/мл (0,003 МЕ). Определению антител к ДНК не мешают присутствующие в плазме крови другие вещества белковой природы, что показано на примере связывания с BSA (не более 7 %).

Таблица 13. Определение антител к ДНК в сыворотках крови с помощью ПКИ (P=0,95; n=5)

№	Диагноз	Активность (ИФА), МЕ/мл	Введено, МЕ/мл	Найдено, МЕ/мл	s_r	Активность (ПКИ), МЕ/мл
1	Хр. гломерулонефрит	8	0,70	0,86±0,12	0,06	10
2	СКВ	320	0,27*	0,30±0,06	0,08	345
3	СКВ	61	5,30	5,4±0,24	0,02	61
4	СКВ	5	0.44	0,36±0,07	0,08	5
5	Ревматоидный артрит	7	0.60	0,56±0,21	0,08	7
6	Ревматоидный артрит	8	0.70	0,79±0,15	0,08	8
7	Ревматоидный артрит	11	0.96	1,02±0,12	0,05	12
8	Ревматоидный артрит	6	0,52	0,57±0,08	0,05	6
9	Ревматоидный артрит	510	0,44*	0,45±0,08	0,05	518

*- разбавление 1:100

Результаты анализа сывороток крови с невысоким содержанием антител к ДНК (менее 8 МЕ, независимо от диагноза) хорошо коррелируют с данными ИФА. При исследовании активных сывороток в диапазоне 280 – 510 МЕ, полученных в основном от пациентов с диагнозом СКВ, необходимо предварительное разбавление образцов в 100 раз. При этом отмечено превышение значений, получаемых с использованием сенсора, что может быть связано с более высокой чувствительностью микровзвешивания по сравнению с ИФА. Высокая чувствительность сенсора позволяет использовать его для определения низких концентраций специфичных к ДНК антител, когда симптомы патологии проявляются только на молекулярном уровне.

Таким образом, показана возможность высокоспецифичного и чувствительного определения микроорганизмов в сложных по составу жидких средах с использованием разработанных ПКИ, которые могут использоваться

для лабораторного медицинского обследования по выявлению инфекционного иерсиниоза и некоторых аутоиммунных заболеваний (СКВ, гломерулонефрит и ревматоидный полиартрит)

ВЫВОДЫ

1 Использование комплексного подхода для характеристики рецепторных покрытий пьезокварцевого иммуносенсора, учитывающего массу и устойчивость биослоя, удельную сорбционную емкость подложки, чувствительность и селективность определения низко- и высокомолекулярных соединений и микроорганизмов, позволяет теоретически обосновать выбор способа иммобилизации биомолекул в зависимости от целей проводимого анализа Установлено, что оптимальное сочетание высокой чувствительности и устойчивости рецепторного слоя достигается при ковалентном прикреплении белковых молекул (антител, гаптен-белковых конъюгатов) и ДНК с помощью глутарового альдегида к подложкам, полученным с использованием метода самособирающихся монослоев из низкомолекулярных веществ (силоксан, липоевая кислота, липиды) Показана возможность направленной ориентации антигенных детерминант молекул ЛПС при повышении гидрофобности подложки

2 Изучены закономерности иммунохимических реакций, протекающих в прямом и обратном направлениях на поверхности электродов пьезокварцевых сенсоров. Рассчитаны константы скорости образования и разрушения иммунных комплексов, константы аффинности биореагентов, что позволяет прогнозировать состав регенерирующих растворов и чувствительность определения биологически активных веществ и микроорганизмов в жидких средах

3 Выявлены доминирующие факторы, влияющие на оперативные характеристики сенсоров, используемых в статическом и проточном режимах (состав и pH буферного раствора, время контактирования иммунореагентов, скорость потока раствора) Предложен алгоритм выполнения проточно-инжекционного анализа с применением пьезокварцевых иммуносенсоров, что позволяет наблюдать за протеканием биохимических реакций в режиме реального времени, автоматизировать анализ и повысить его производительность

4 Установлено химическое строение О-специфических полисахаридов, выделенных из патогенных грамотрицательных бактерий *Y enterocolitica* сероваров О 3, О 5, О 5,27 и О·6,31 для теоретического обоснования антигенной специфичности молекул ЛПС Обоснованы новые области применения ЛПС в качестве рецепторных покрытий пьезокварцевого иммуносенсора для повышения чувствительности и селективности определения антител

5. С целью прогнозирования селективности определений БАВ и микроорганизмов рассчитаны коэффициенты перекрестного взаимодействия иммобилизованных антигенов с гомо- и гетерологичными антителами и неспе-

цифическими белками, а также поли- и моноклональных антител с антигенами, гаптенами и их структурными аналогами Выявлена индивидуальная и групповая специфичность антител, использование которых позволяет создавать иммуносенсоры для определения индивидуальных компонентов или суммарного содержания близких по строению веществ

6 Разработан комплекс методик высокочувствительного (на уровне нг/мл) определения низкомолекулярных веществ (сульфометоксазола, салициловой кислоты, нонилфенола, котинина) в объектах окружающей среды (вода, почва), пищевых продуктах (молоко, мясо, яйца), лекарственных препаратах и биологических жидкостях (молоко, урина), которые предназначены для выполнения анализа без предварительной сложной пробоподготовки

7 Предложены сенсоры на основе иммобилизованных антител для экспрессного определения микроорганизмов (бактериофагов *Y pestis* и бактерий *Y enterocolitica*) и оценки качества питьевой воды, свежих овощей и фруктов, рекомендуемые для санитарно-гигиенического контроля в очагах распространения инфекции Минимальные определяемые концентрации бактериофагов и бактерий составляют 0,2 10^5 и 0,1 10^4 частиц/мл соответственно

8 Предложены высокочувствительные и селективные ПКИ на основе иммобилизованных ДНК и ЛПС для прямого определения специфичных антител на уровне мкг/мл Продемонстрирована возможность проточно-инжекционного определения специфичных антител для количественной характеристики активности сывороток крови в процессе ранней клинической диагностики иерсиниоза и некоторых аутоиммунных заболеваний (системной красной волчанки, гломерулонефрита и ревматоидного артрита), а также мониторинга состояния больных при лечении

Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих публикациях

1 Gorshkova R P Studies of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* VA and VB [Text] / R P Gorshkova, N I Korchagina, E N Kalmykova, T I Medonova, N I Besednova , Yu S Ovodov // Carbohyd Res – 1980 – V 84 – P 237-243

2 Горшкова Р П Липополисахариды *Yersinia enterocolitica* / Р П Горшкова, Е Н Калмыкова, В В Исаков, Ю С Оводов [Текст] // Вопросы микробиологии, патогенеза и лабораторной диагностики иерсиниозов. Новосибирск, 1985 – С 16-20

3 Gorshkova R P / Structural studies on O-specific polysaccharides from lipopolysaccharides *Yersinia enterocolitica* serovars O 5 and O:5,27 [Text] / R P Gorshkova, E N Kalmykova, V V Isakov, Yu S Ovodov // Eur J Biochem – 1986 – V 156 – P 391-397

4 Горшкова Р П Исследование липополисахаридов из микроорганизмов *Yersinia enterocolitica* [Текст] / Р П Горшкова, Е Н Калмыкова, З Г Со-

фьина, Л Л Седакова, Р А Фирсова, В Г Мазаева, Ю С Оводов // Химиотерапия опухолей в СССР – 1984 – № 44 – С 188-193

5 Gorshkova R P Structural studies on the O-specific polysaccharides from lipopolysaccharides *Yersinia enterocolitica* serovars O 1,2a,3, O 1,2a,2b,3 and O 3 [Text] / R P Gorshkova, E N Kalmykova, V V Isakov, Yu S Ovodov // Eur J Biochem – 1985 – V 150 – P 527-531

6 Калмыкова Е Н Структура О-специфического полисахарида из липополисахарида *Yersinia enterocolitica* О 6,31 [Текст] / Е Н Калмыкова, Р.П Горшкова, В В Исаков, Ю С Оводов // Биоорг хим – 1988 – Т 14 – С 652-657

7 Фролова Г М Иммунохимическое изучение липополисахаридов *Yersinia enterocolitica* сероваров О 5 и О 5,27 [Текст] / Г М Фролова, Р П Горшкова, Е Н Калмыкова, Ю С Оводов // Журн микробиол , эпидемиол иммунол – 1988 – № 12 – С 90-94

8 Калмыкова Е.Н Необычные моносахариды в О-факторах липополисахаридов грамотрицательных бактерий [Текст] / Е Н Калмыкова, Р П Горшкова, Ю С Оводов // Хим. природн соедин – 1989 – № 6 – С 743-763

9 Алексеева Н Т Изменение состава белковой оболочки у кадмий устойчивых псевдомонад [Текст] / Н Т Алексеева, Д А Анисимов, В А Хоменко, Е Н Калмыкова, И А Беленева, Л С Шевченко // Биол мембраны – 1991 – № 8 – С 800-804

10 Ovodov Yu S Chemical and immunochemical studies on LPS of *Yersinia* species - A Review of Some Recent Inverstigations [Text] / Yu S Ovodov, R P Gorshkova, S V Tomshich, N A Komandrova, E N Kalmykova, V A Zubkov, V V Isakov // J Carbohydr Chem – 1992 – № 11 – P 21-35

11 Gorshkova R P. Structural studies of O-specific polysaccharidies chains of the lypopolysaccharidies from *Yersinia enterocolitica* serovar O 10 [Text] / R P Gorshkova, E N Kalmykova, V V Isakov, Y S Ovodov // Carbohyd Res – 1995 – V 268 – P 249-255

12 Калмыкова Е Н Пьезокварцевые иммуносенсоры в анализе водных сред [Текст] / Е Н Калмыкова, М В Струкова, С А. Еремин, Т Н Ермолаева // Вестник ЛГТУ-ЛЭГИ – 2000 – Т 6 – №2 – С 74-78

13 Ермолаева Т Н Пьезокварцевые биосенсоры для определения органических соединений в воде и воздухе [Текст] / Т Н Ермолаева, Е Н Калмыкова, Т Л Лаврентьева // Микросист техника – 2001 – № 9 – С 21-28

14 Калмыкова Е Н Разработка пьезокварцевых иммуносенсоров для проточно-инжекционного анализа высоко- и низкомолекулярных соединений [Текст] / Е Н Калмыкова, Т Н Ермолаева, С А Еремин // Вест Моск университета Серия 2. Химия – 2002, – Т 43 – № 6. – С 399-403

15 Ермолаева Т Н Пьезогравиметрический иммуносенсор для определения бактериофагов в жидких средах [Текст] / Т Н Ермолаева, Е Н Калмыкова, Е С Дергунова // Сб научных трудов преподавателей и сотрудников ЛГТУ Липецк, 2003 – С 59-61

16 Калмыкова Е.Н. Кинетические исследования аффинного взаимодействия и их применение при разработке пьезокварцевых иммуносенсоров [Текст]

/ Е Н Калмыкова, Е.В Мелихова, Е С Дергунова, С.А Еремин, Т Н Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы – 2004 – Т 4 – № 5 – С 597-602

17 Калмыкова Е Н Пьезокварцевый иммуносенсор для проточного определения сульфопрепаратов в жидкостях [Текст] / Е Н Калмыкова, М В Милонов, Е В Мелихова, С А Еремин, Т Н Ермолаева // Сенсор – 2005 – № 2 – С 14-20

18 Калмыкова Е.Н Пьезокварцевые иммуносенсоры Регистрация гетерогенных иммунохимических реакций методом пьезокварцевого микровзвешивания [Текст] / Е Н Калмыкова, Т Н Ермолаева // Изв вузов. Хим и химтехнол – 2005 – Т 48 – Вып 12 – С 76-80

19 Калмыкова Е Н Пьезокварцевые иммуносенсоры II Селективное определение биологически активных веществ в жидких [Текст] / Е.Н Калмыкова, Т Н Ермолаева // Изв вузов Хим и химтехнол – 2005. – Т 48 – Вып 12 – С 92-95

20 Калмыкова Е Н Пьезокварцевые иммуносенсоры на основе иммобилизованных липополисахаридов для определения антител к бактериям Yersinia enterocolitica [Текст] / Е Н Калмыкова, Е Н Дергунова, Т Н Ермолаева, Р П Горшкова, Н А Командрова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006 – Т 6 – № 3 – С 415-422

21 Ермолаева Т Н Проточно-инжекционное определение нонилфенола в жидких средах с помощью пьезокварцевого иммуносенсора [Текст] // Т Н Ермолаева, Е С Дергунова, Е Н Калмыкова, С А Еремин / Журн аналит хим – 2006 – Т 61 – № 6. – С 1-6

22 Мелихова Е В Применение проточного пьезокварцевого иммуносенсора для определения сульфаметоксазола в объектах окружающей среды [Текст] / Е В Мелихова, Е Н Калмыкова, С А Еремин, Т Н Ермолаева // Журн аналит хим – 2006 – Т 61 – № 76 – С 744-750

23 Ермолаева Т Н Пьезокварцевые иммуносенсоры Аналитические возможности и перспективы [Текст] / Т Н Ермолаева, Е Н Калмыкова // Успехи химии – 2006 – Т 75 – №5 – С 445-459

24 Калмыкова Е.Н Новые технологии в лабораторной диагностике иерсиниоза / Е Н Калмыкова, Т Н Ермолаева, Н Ю Зубова [Текст] // Технические науки – региону сб научн тр преподавателей и сотрудников ЛГТУ, посвященный 50-летию Липецкого государственного технического университета Липецк, 2006 – С 39-46

25 Ермолаева Т Н Пьезокварцевые сенсоры Аналитические возможности и перспективы [Текст] / Т Н Ермолаева, Е Н Калмыкова Липецк, 2007 – 190 с

26 Калмыкова Е Н Пьезокварцевые иммуносенсоры на основе иммобилизованных антител для определения бактерий *Yersinia enterocolitica* в водных средах [Текст] / Е Н Калмыкова, А В Гарбузова, О Ю Шашканова, Н Ю Зубова, Т Н Ермолаева // Изв вузов Хим и химтехнол – 2007 – Т 50 – Вып 9 – С. 10-15

27 Шашканова О Ю. / Проточные пьезокварцевые иммуносенсоры для определения фагов [Текст] / О Ю Шашканова, Е С Дергунова, Е Н Калмыкова, Т Н Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы – 2007 – Т 7 – № 4 – С 548-555

28 Калмыкова Е Н Применение сульфатированных полисахаридов для активации электродов пьезокварцевого иммуносенсора [Текст] / Е Н Калмыкова, А В Гарбузова, О Ю Шашканова, Н Ю Зубова, Т Н Ермолаева // Вестник Воронежского государственного университета Сер . Химия Биология Фармация – 2007 – № 1 – С 47 – 52

29 Патент РФ № 228720 Способ детектирования сульфаметоксазола с помощью пьезокварцевого иммуносенсора / Т Н Ермолаева, Е Н Калмыкова, Е В Мелихова // Б И № 6, 2006

30 Патент РФ № 2287820 Способ селективного определения нонилфенола в растворе с помощью пьезокварцевого иммуносенсора / Т Н Ермолаева, Е С Дергунова, Е Н Калмыкова // Б И № 32, 2006

31 Патент РФ № 2287585 Состав покрытия пьезокварцевого резонатора для определения антител *Yersinia enterocolitica* в водных средах / Е Н Калмыкова, Е С. Дергунова, Т Н Ермолаева, Р П Горшкова, Н А Командрова // Б И № 32, 2006

32 Патент РФ № 2288472 Способ определения концентрации антител в сыворотках крови к патогенным бактериям *Yersinia enterocolitica* сероваров О 3, О.5 или О.6,30 с применением пьезогравиметрического иммуносенсора / Е Н Калмыкова Е С Дергунова, Т Н Ермолаева, Р П Горшкова, Н А Командрова // Б И. № 33, 2006

Работы № 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28 опубликованы в изданиях, входящих в список ВАК

Подписано в печать 5 07 2007г Формат 60х84 1/16 Бумага офсетная
Ризография Печ л 2,6 Заказ № 665 Тираж 100
Липецкий государственный технический университет
Типография ЛГТУ, 398600 г Липецк, ул Московская, 30