

ПРИМЕНЕНИЕ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ АКТИВАЦИИ ЭЛЕКТРОДОВ ПЬЕЗОКВАРЦЕВОГО ИММУНОСЕНСОРА

Е. Н. Калмыкова, А. В. Гарбузова, Т. Н. Ермолаева, Н. Ю. Зубова*

Липецкий государственный технический университет,

** ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии Липецкой области*

Предложен способ получения биочувствительного слоя пьезокварцевых сенсоров на основе специфических антител, иммобилизованных на подложку сульфатированного полисахарида (каррагинана), для проточно-инжекционного определения патогенных грамотрицательных бактерий *Y. enterocolitica* серологического варианта О:3 в водных средах. Установлено, что использование полисахарида значительно повышает прочность биослоя сенсора.

ВВЕДЕНИЕ

Пьезокварцевые иммуносенсоры — миниатюрные аналитические устройства, предназначенные для экспрессного, высокочувствительного и селективного анализа многокомпонентных жидкостей, не требующих сложной пробоподготовки [1—4]. Эти качества особенно важны при проведении большого числа лабораторных медико-биологических и экологических исследований, например для определения патогенных грамотрицательных бактерий *Yersinia enterocolitica*, которые являются возбудителями инфекционного кишечного заболевания — иерсиниоза, занимающего значительное место в патологии человека и животных [5—7]. Одним из существенных недостатков используемых в настоящее время для этих целей методов клинической диагностики (микробиологические, иммунохимические) является длительность выполнения анализа (от нескольких часов до нескольких дней). Использование пьезоиммуносенсора позволяет проводить анализ за 5—10 минут.

Взаимодействие аналита с биочувствительным слоем приводит к изменению частоты (f), амплитуды (A) и фазы (φ) колебаний пьезокварцевого преобразователя [2] в зависимости от изменения вязкости, плотности, упругости, проводимости и массы рецепторного слоя. Наиболее изучены иммуносенсоры, чувствительные к изменению микровесов, которые известны как микро- или нановесы. Аналитическим сигналом гравиметрического пьезокварцевого сенсора служит уменьшение частоты колебаний при увеличении массы рецепторного покрытия электрода при связывании иммобилизованных антител (At) с клетками микро-

организмов, поэтому для регистрации образующегося иммунного комплекса не требуется дополнительного введения меток. Кроме того, они характеризуются малой инерционностью, легкостью в эксплуатации, портативностью, и возможность многократного использования после регенерации биослоя. В настоящее время пьезокварцевые иммуносенсоры можно рассматривать как принципиально новый инструмент при проведении большого числа анализов по оценке качества питьевой воды, продуктов питания и других объектов, содержащих патогенные микроорганизмы.

Важным этапом разработки сенсоров является получение биоселектирующего покрытия электродов, качество которого определяет эффективность взаимодействия рецепторных молекул с определяемыми веществами, а следовательно, чувствительность и воспроизводимость определений. К настоящему времени для иммобилизации антител наиболее распространенными приемами являются физическая, специфическая и химическая сорбция, в отдельных случаях комбинируют различные приемы [3, 4]. Однако, заранее предсказать наиболее подходящий способ для достижения конкретной цели практически невозможно, поскольку каждый из них имеет свои достоинства и недостатки. Обычно для осуществления выбора оптимального способа иммобилизации распознающих молекул требуется проведение экспериментальных исследований.

Цель работы — исследование влияния природы модификатора (белок — конканавалина А и сульфатированный полисахарид — каррагинан) золотых электродов пьезокварцевых резонаторов на качество получаемого биорецепторного слоя на основе иммобилизованных антител к патогенным бактериям *Yersinia enterocolitica* серовара О:3.

© Калмыкова Е. Н., Гарбузова А. В., Ермолаева Т. Н., Зубова Н. Ю., 2007

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Химические реагенты. В работе использовали глутаровый альдегид (GA) ("Reanal", Hungary), конканавалин А ("Sigma", USA), хлорид, гидрофосфат и азид натрия; хлорид, дигидрофосфат и роданид калия; соляную кислоту, тиомочевину, пептон, сульфат аммония и магния, хлорид меди и железа, глюкозу и серный эфир, хлороформ, этиловый спирт (ч.д.а., Россия).

Буферный фосфатный физиологический раствор (PBS) pH 7,2 готовили на основе бидистиллированной воды, содержащей (г/л): NaCl (8,0); KCl (0,2); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2,9); KH_2PO_4 (0,2).

Сульфатированные полисахариды, выделенные из красных водорослей Японского моря, любезно предоставлены ст.н.с. И.М. Ермак (Институт биорганической химии ДВО РАН).

Образцы микроорганизмов. *Y. enterocolitica* серологической вариант О:3 (штамм 181, выделен от больного). Нарботку микробной массы выполняли в соответствии с методикой [8]. Суточную культуру бактерий S-форм, выращенную на агаровой питательной среде, смывали PBS, одномиллиардную взвесь клеток готовили по стандарту мутности и прогревали при 100 °С 30 мин. Образцы проб с различной концентрацией клеток готовили соответствующим разбавлением исходной взвеси ($1 \cdot 10^9$) в PBS.

В качестве биорецепторных молекул использовали лиофилизированные моноклональные антитела (Ат) к бактериям *Y. enterocolitica* О:3 из набора сухого эритроцитарного диагностикума РНГА (производства НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург). Рабочий раствор Ат получали растворением навесок сухих образцов (1 мг) в 1 мл PBS и последующим 10-кратным разбавлением буферным раствором.

В работе использовали резонаторы АТ-среза (собственная частота колебаний 8—10 МГц) с золотыми электродами (диаметр 4 мм), полученными термическим напылением золота на шлифованную кварцевую пластинку (ЗАО «ЭТНА», Россия), на поверхности которого иммобилизовали биореагенты.

Регенерацию биослоя после каждого измерительного цикла осуществляли 0,3 М KCNS. Полное очищение металлической поверхности осуществляли обработкой электродов 2М HCl.

Определение бактерий с использованием пьезокварцевого иммуносенсора с иммобилизованными антителами. Исследование иммунохимических реакций Ат, иммобилизованных на

подложке, с образцами водных смесей, содержащих бактериальные клетки, выполняли при комнатной температуре в проточном режиме. Установка для проточно-инжекционного анализа, разработанная на кафедре химии ЛГТУ [9], включает следующие основные блоки: дозатор ввода анализируемой пробы, регенерирующего раствора, или фосфатного буфера; проточную микро-ячейку детектирования (объем не более 20 мкл) с закрепленным сенсором, контактирующим одной стороной с жидкостью; генератор возбуждения колебаний резонатора; перистальтический насос, регулирующий скорость потока раствора и частотомер ЧЗ-54 (Россия). Все узлы проточно-инжекционной системы соединены силиконовыми трубками диаметром 0,16 мм. Скорость потока-носителя составляла 90 мкл/мин. Изменение частоты колебаний сенсора регистрировали с интервалом в 15 секунд.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наряду с общими требованиями, предъявляемыми к иммобилизованным иммунореагентам (прочность закрепления, доступность центров связывания, сохранение активности) при формировании биослоя гравиметрического пьезокварцевого сенсора следует учитывать необходимость получения химически и физически устойчивого биослоя с минимальной массой. Это особенно важно при определении микроорганизмов, поскольку сорбция крупных аналитов может вызывать отрыв рецепторных молекул или перегрузку сенсора.

Эффективность и качество исследованных покрытий, определяющих стабильность работы сенсора при проточно-инжекционном определении бактерий, оценивали по следующим параметрам:

- масса пленочного покрытия (мкг), рассчитанная по уравнению Зауэрбрея [10]:

$$\Delta f = -2,3f_0^2 \cdot 10^{-6} \Delta m/A,$$

где Δf — изменение частоты колебаний кристалла, Hz; f_0 — собственная частота колебаний кристалла, MHz; m — масса нанесенного на электрод покрытия, г; A — площадь поверхности электрода, см^2 .

- концентрационная чувствительность сенсора (S_c , Гц · мкг⁻¹) [11], показывающая изменение частоты колебаний (Δf) при введении в поток раствора-носителя анализируемой пробы: $S_c = \Delta f/m_{\text{Ат}}$, где $m_{\text{Ат}}$ — масса антител, закрепленных на поверхности электрода сенсора, мкг;

- удельная сорбционная емкость подложки ($C_{\text{уд}}$) [12], равная отношению массы иммобилизованных Ат к массе подложки: $C_{\text{уд}} = m_{\text{Ат}}/m_{\text{подл}}$, ха-

Таблица 1

Влияние способа формирования биорецепторного покрытия на характеристики биорецепторного слоя сенсора ($n = 3$; $P = 0,95$)

Способ иммобилизации	Подложка	$m_{\text{подл}}$, МКГ	$m_{\text{Ат}}$, МКГ	$m_{\text{биослой}}$	$C_{\text{уд}}$	S_c^*	N
1	—	—	8,8	8,8	—	1,9	1—3
2-1	ПС	18,4	5,5	23,9	0,3	0,7	16
2-2		20,0	7,5	27,5	0,4	0,7	28
2-3		22,4	8,6	31	0,4	0,5	26
3	Кон А	8,0	4,8	12,8	0,6	1,7	7

* — установлена при исследовании пробы ($C = 4,9 \cdot 10^4$ клеток/мл)

рактирующая емкость единицы массы пленочного покрытия;

- линейный диапазон определяемых содержания бактерий [11];
- предел обнаружения (ПрО), рассчитываемый по 3S-критерию с учетом сигнала шума;
- число измерительных циклов (N) без снижения аналитического сигнала сенсора.

Иммобилизация антител на поверхности золотого электрода пьезокварцевого резонатора предусматривает необходимость тщательной предварительной очистки металлической поверхности. Для этой цели резонаторы последовательно обрабатывали 1 н щелочными и кислотными растворами, выдерживая по 10 мин., прополаскивали дистиллированной водой, спиртом и высушивали на воздухе до постоянной массы. Регистрацию изменения частоты колебаний сенсора при выполнении каждой стадии формирования биослоя контролировали методом пьезокварцевого микровзвешивания.

Иммобилизацию биомолекул выполняли тремя способами: прямым закреплением на металлической поверхности (способ 1), ковалентной прививкой к гидрофильным подложкам на основе сульфатированных полисахаридов (ПС) с различным содержанием сульфатных групп (способы 2—1; 2—2 и 2—3,) и белка — конканавалина А (Кон-А — способ 3), предварительно нанесенными на электроды.

Способ 1. При использовании золотых электродов наиболее простым и быстрым методом иммобилизации Ат, является непосредственное нанесение раствора иммуноглобулинов на поверхность золотых электродов. Для этого каплю

раствора Ат (0,01% в PBS, 5 мкл) помещали на свежее очищенную поверхность электрода и выдерживали не менее 24 ч при +4 °С во влажной камере. После промывания в PBS и дистиллированной воде сенсоры высушивали на воздухе до постоянной массы. В литературе такой способ известен как «физическая сорбция», однако прикрепление белковых молекул осуществляется также за счет образования координационных связей между атомами золота и серы, входящей в состав дисульфидных связей [13, 14].

Оценка активности иммобилизованных Ат осуществлялась по величине концентрационной чувствительности сенсора, регистрируемой при взаимодействии с бактериями *Y. enterocolitica* серовара О:3 (фиксированная концентрация $4,9 \cdot 10^4$ клеток/мл) в проточном режиме. Полученный биослой характеризуется не только минимальной массой (8,8 мкг), но и максимальной концентрационной чувствительностью — 1,9 (табл. 1). Высокая эффективность взаимодействия антител указывает на сохранение активных центров связывания при иммобилизации в мягких условиях. Однако в нашем случае прочного закрепления антител не происходило. Уменьшение массы биослоя наблюдалось уже в процессе промывания или после 1—3 измерительных циклов. Поэтому такой способ может использоваться только в исследовательских целях для получения сенсоров, от которых не требуется длительного срока эксплуатации.

Ковалентная прививка антител к эластичным гидрофильным пленкам с помощью бифункционального реагента (способы 2 и 3) позволяет получать более устойчивые покрытия и обеспечивает

возможность многоразового использования биослоя сенсора после регенерации ($N = 18—28$ и 7 , соответственно).

Способ 2 — предусматривает нанесение на металлическую поверхность капли водного 0,1%-ного раствора полисахаридов, содержащего различное количество сульфогрупп (20% — способ 2—1; 24% — способ 2—2 и 27% — способ 2—3) с последующим выдерживанием 24 ч при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ во влажной камере. Для удаления несвязавшихся молекул полисахаридов, модифицированные резонаторы промывали PBS, поместив в стакан с магнитной мешалкой (30 мин.). После высушивания на воздухе на полученную пленку помещали свежеприготовленный 5%-ный водный раствор глутарового альдегида (5 мкл) и затем, после выдерживания в течение 20 мин. при комнатной температуре, наносили рабочий раствор антител (5 мкл). Иммуносенсор хранили во влажной камере 10—12 часов при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, промывали 30 мин. в буферном растворе и высушивали на воздухе.

Способ 3. Аналогично получали биослой с белковой подложкой, используя 0,1%-ный раствор конканавалина А, который готовили растворением 1 мг сухого лиофилизованного образца в 1 мл PBS.

При оценке влияния модификаторов электродов зафиксированы более высокие массы полисахаридных пленок по сравнению с белковыми, что может быть обусловлено различными молекулярными массами макромолекул или количеством центров связывания между атомами серы и золота.

В пользу второго предположения указывает увеличение массы полисахаридных пленок в зависимости от содержания сульфатных групп в составе полисахаридов (18,4—22,4 мкг). Использование белковой подложки позволяет получать биослой, который характеризуется более сорбционной емкостью (0,6) и концентрационной чувствительности иммобилизованных антител ($1,7\text{ Гц} \cdot \text{мкг}^{-1}$). При этом отмечены близкие между собой значения удельной емкости полисахаридной подложки (0,3—0,4), и, как следствие, концентрационной чувствительности биослоя (0,5—0,7 $\text{Гц} \cdot \text{мкг}^{-1}$), что отражает природу макромолекул подложки. Уменьшение антиген-связывающей активности ковалентно закрепленных антител (способы 2 и 3) вызвано применением бифункционального кросс-линкера, инактивирующего часть сайтов связывания антител [4, 13].

Однако неоспоримым преимуществом биослоя, сформированного на полисахаридных подложках, является устойчивость при выполнении анализа, которая в 2—4 раза выше, чем при использовании конканавалина А. Это может быть связано с различной конформационной доступностью атомов серы при образовании координационных связей с золотом, поскольку полисахариды имеют линейное строение и отличаются более высокой адгезией к золоту по сравнению с белками, у которых часть дисульфидных связей локализована внутри белковой глобулы (рис. 1).

Полученные данные показывают, что активация электродов полисахаридами, независимо от

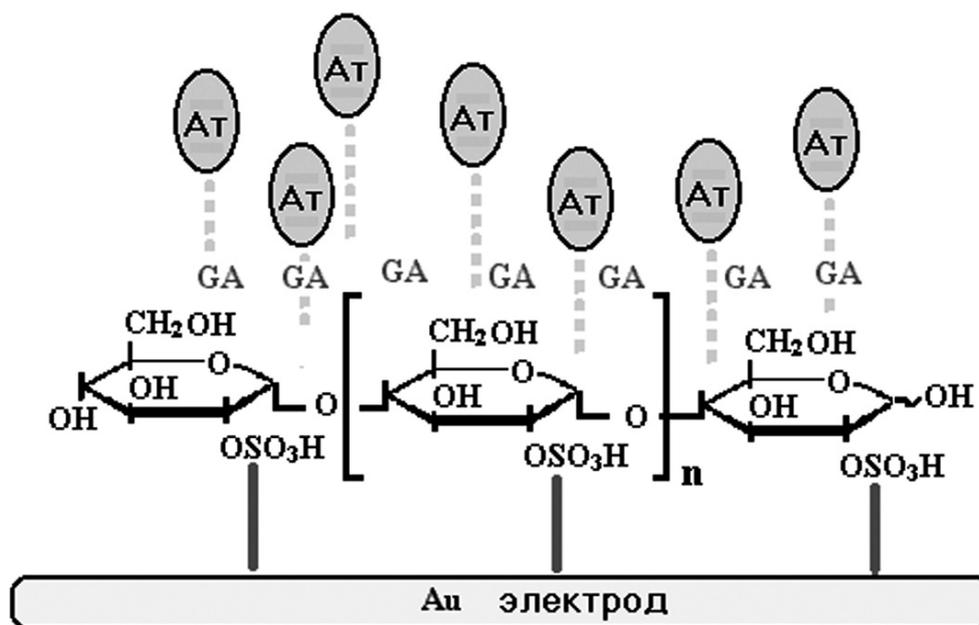


Рис. 1. Схема рецепторного слоя иммуносенсора с подложкой на основе сульфатированного полисахарида

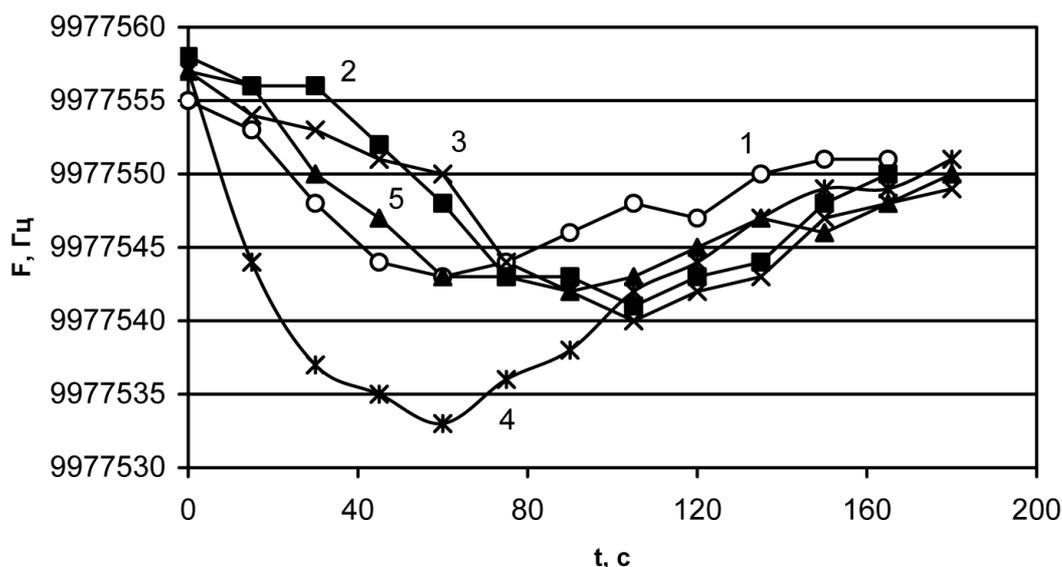


Рис. 2. Зависимость аналитического отклика сенсора от концентрации бактерий *Yersinia enterocolitica* серовара 0:3 (способ 2—1): 1 — $0,1 \cdot 10^4$ клеток/мл; 2 — $0,3 \cdot 10^4$ клеток/мл; 3 — $0,6 \cdot 10^4$ клеток/мл; 4 — $1,2 \cdot 10^4$ клеток/мл; 5 — $4,9 \cdot 10^4$ клеток/мл

концентрации сульфатных групп (в диапазоне 20—27%) способствует получению более устойчивого биослоя, что позволяет проводить до 28 измерительных циклов.

Графики зависимости аналитического сигнала сенсора от концентрации микроорганизмов (рис. 2) получали с использованием суспензий с концентрацией $0,06—1,5 \cdot 10^4$ клеток/мл, приготовленных разбавлением одномиллиардной взвеси убитых кипячением клеток буферным физиологическим раствором.

В диапазоне концентраций $0,1—1,2 \cdot 10^4$ клеток/мл отмечается прямо пропорциональное уменьшение частоты колебаний сенсора. Дальнейшее увеличение концентрации микроорганизмов ($4,9 \cdot 10^4$ клеток/мл) приводит к снижению абсолютного значения аналитического отклика, поскольку для обратимых иммунохимических реак-

ций избыток антигена (бактериальных клеток) вызывает диссоциацию образовавшегося на поверхности сенсора иммунного комплекса. Аналогично полученные результаты связывания иммунореагентов для каждого иммуносенсора позволили установить линейный диапазон определяемых концентраций и предел обнаружения бактериальных клеток (табл. 2).

Линейный диапазон определяемых концентраций соответствует достаточно узкому интервалу для всех сенсоров, что может быть связано с природой микроорганизмов (величина клеток, доля R-мутантов, присутствующая в пробе). Для сенсоров с покрытиями на полисахаридной подложке отмечен низкий предел обнаружения микробов ($0,02—0,04 \cdot 10^4$ клеток/мл), свидетельствующий о высокой чувствительности определений, и удовлетворительная воспроизводимость измерений (0,4—0,6).

Таблица 2

Оперативные характеристики иммуносенсоров

Подложка	Способ иммобилизации	Линейный диапазон, 10^{-4} клеток/мл	PrO, 10^{-4} клеток/мл	Sr
ПС	2-1	0,1—1,2	0,1	0,06
	2-2	0,06—0,6	0,04	0,04
	2-3	0,06—0,6	0,02	0,06
Кон-А	3	0,1—0,6	0,10	0,08

Применение пьезокварцевых иммуносенсоров на основе иммобилизованных антител перспективно для использования при оценке качества питьевой воды, продуктов питания и различных видов биологического материала для определения бактерий *Y. enterocolitica* серовара О:3, что особенно важно при проведении санитарно-гигиенических мероприятий в очагах распространения кишечной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной сравнительной оценки различных способов формирования биораспознающего слоя сенсора (прямое закрепление рецепторных молекул антител к бактериям *Yersinia enterocolitica* серологического варианта О:3 на металлической поверхности; ковалентное прикреплени к конканавалину А и природного сульфатированного полисахарида — каррагинана с различным содержанием сульфатных групп) показано, что использование сульфатированных полисахаридов значительно повышает прочность биослоя сенсора. Предложен способ получения распознающего покрытия электродов пьезокварцевых сенсоров на основе специфических антител, иммобилизованных на подложку полисахарида каррагинана, для проточно-инжекционного определения патогенных грамотрицательных бактерий *Y. enterocolitica* О:3 в водных средах.

Работа выполнена при поддержке гранта «Создание новых высокочувствительных гравиметрических иммуносенсоров для ранней клинической диагностики инфекционных и аутоиммунных заболеваний» РФФИ №06-03-32226.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Guilbault G.G., Ngeh-Ngwainbi J.* // In Guilbault G., Mascini M. Analytical Uses of Immobilized Biological Compounds for Detection, Medical and Industrial Uses. // NATO ASI Series. 1988. P. 187
2. *Cavic B. A.* Acoustic and the study of biochemical macromolecules and cells at the sensor-liquid interface. / B. A. Cavic, G. L. Hayward, M. Thompson // *Analyst* — 1999. — V. 124. — P. 1405—1420.

3. *Skladal P.* Piezoelectric Quartz Crystal Assays and Characterization of Affinity Interactions // *J. Braz. Chem.* — 2003. — V. 14, № 4. — P. 491—502.

4. *Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н.* Пьезокварцевые иммуносенсоры. Аналитические возможности и перспективы / Т.Н. Ермолаева, Е.Н. Калмыкова // *Успехи химии.* — 2006. — Т. 75, №5. — С. 445—459.

5. *Горшкова Р.П.* Липополисахариды *Yersinia enterocolitica* / Р.П. Горшкова, Е.Н. Калмыкова, В.В. Исаков, Ю.С. Оводов // В кн. “Вопросы микробиологии, патогенеза и лабораторной диагностики иерсиниозов”. Новосибирск. — 1985. — С. 16—20.

6. Псевдотуберкулез и иерсиниоз (эпидемиология, клиника, диагностика, терапия) Методические рекомендации. Санкт-Петербург. — 2005. 50 с.

7. Инфекции, обусловленные иерсиниями // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. — СПб. НИИЭМ им. Пастера. — 2006. — 153 с.

8. *Ovodov Yu.S., Gorshkova R.P., Tomshich S.V.* // *Immunochemistry.* — 1974. — V. 11, № 12. — P. 777.

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

10. *Sauerbrey G.Z.* Use a quartz vibration form weigh thin films on a microbalance / G.Z. Sauerbrey. // *Z. Phys.* — 1959. — V. 155. — P. 206—210.

11. *Buck R. P.* Piezoelectric Chemical Sensors (IUPAC Technical Report) / R. P. Buck, E. Lindner, W. Kutner, G. Inzelt // *Pure Appl. Chem.* — 2004. — V. 76, №6. — P. 1139—1160.

12. *Калмыкова Е.Н.* Пьезокварцевые иммуносенсоры на основе иммобилизованных липополисахаридов для определения антител к бактериям *Yersinia enterocolitica* / 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.

13. *Babacan S., Privarnik P., Letcher S., Rand A.G.* Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application // *Biosens. Bioelectron.* — 2000. — V. 15. — P. 616.

14. *Wink T.* Self-assembled Monolayers for Biosensors / T. Wink, S.Y. van Zuilen, A. Bult, W.P. van Bennekom // *Analyst.* — 1977. — V. 122. — P. 43R—45R.