

ІМУННИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ІОНСЕЛЕКТИВНИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ЕКСПРЕСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Ю. О. Огороднійчук, аспірантка*
М.Ф. Стародуб, доктор біологічних наук

Запропоновано новий тип імунного біосенсора на базі іонселективних польових транзисторів (ІСПТ) з пористою поверхнею CeO_x замість Si_3N_4 , що сприяє підвищенню чутливості і стабільності аналізу. Зазначений біосенсор використано для визначення *Salmonella typhimurium* у модельних розчинах. Показано, що чутливість при проведенні аналізу на наявність сальмонел становила близько 2-3 клітин/мл і лінійно зростала до 5×10^5 клітин/мл. Зроблено висновок, що електрохімічна реєстрація сигналу з використанням CeO_x пористої поверхні ІСПТ відповідають вимогам щодо створення дешевих імунних біосенсорів для визначення бактеріального забруднення об'єктів навколишнього середовища.

Імунний біосенсор, іонселективний польовий транзистор, CeO_x пориста поверхня, *Salmonella typhimurium*, модельний розчин.

Salmonella typhimurium, на ряду з іншими представниками роду *Salmonella*, є одним із біологічних агентів, що найчастіше викликає харчові токсикоінфекції. Вони потрапляють в організм людини з їжею і викликають тяжкі отруєння. Причиною виникнення токсикоінфекцій найчастіше є харчові продукти (м'ясо, яйця та ін.), заражені живими мікроорганізмами. Традиційні методи діагностики інфекційних захворювань зазвичай включають три етапи: мікробіологічний аналіз, серологічну і біологічну діагностику [15, 22].

Комплексні підходи, що використовуються для діагностики бактеріальних захворювань, є дуже рутинні, дорогі і вимагають використання стаціонарного обладнання і високопрофесійного персоналу. Щоб подолати ці недоліки, хоча б на стадії визначення або на рівні серотипування можливе використання нових методів біосенсорики. Раніше [9, 17, 18], нами було розроблено оптичні імунні біосенсори на базі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) та еліпсометрії повного внутрішнього віддзеркалення (ЕПВВ). Діапазон визначення *S. typhimurium* за допомогою імунного біосенсора на базі ППР становив 2×10^2 – 10^7 клітин/мл, а чутливість аналізу при використанні імунного біосенсора на базі ЕПВВ сягала близько 5 клітин/10мл. Обидва підходи можуть бути виконані «прямим» методом, коли специфічні антитіла іммобілізують на поверхні перетворювача, попередньо обробленого поліаліламін гідрохлоридом і білком А, які зв'язують клітини *S. typhimurium*, що знаходяться в модельному розчині. Подібні результати були отримані також іншими авторами [5, 7, 12, 14, 19 – 23], які використовували прилад "Bioscore". Але інфекційна доза патогенних мікроорганізмів становить менше, ніж 10 клітин на 100 мл [4], тому необхідно шукати шляхи для підвищення чутливості.

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб

© Ю. О. Огороднійчук, М. Ф. Стародуб, 2014

Нами було розроблено новий тип імунних біосенсорів на базі ІСПТ для контролю деяких біохімічних величин [7, 16] та токсичних речовин [12, 21]. Останнім часом для підвищення чутливості і стабільності цього типу біосенсорів було запропоновано замінити на поверхні трансдюсера нітрид кремнію на оксид церію [10, 11].

Мета досліджень – розробка нового типу імунного біосенсора на основі використання ІСПТ на базі оксиду церію для визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах.

Матеріали та методика досліджень. *Підготовка імунного біосенсора на основі ІСПТ.* Підготовка біосенсора здійснювалася так. На першому етапі було проведено очистку поверхні ІСПТ від залишку імерсійної рідини. Для цього використовували таку суміш: біхромат калію і сірчаної кислоти (10 с), води, ацетону, етанолу і 10 мМ Na-фосфатного буферу (РВ), рН 7,3, що містить 100 мМ NaCl. Далі на поверхню трансдюсера наносили водний розчин цистаміну (10 мг/мл) і там витримували його протягом 30 хв при кімнатній температурі (~ 23 °С), після чого цю процедуру здійснювали повторно. Далі поверхню двічі активували протягом 20 хв за допомогою водного розчину глутаральдегіду (ГА) від компанії Sigma. На активовану поверхню наносили розчин білка А від *Staphylococcus aureus* (Sigma) (20 µг/мл), або сироватку крові людини в розведенні 1:2 і витримували їх там протягом 30 хв в умовах вологого середовища. Після ретельного промивання поверхні за допомогою РВ на неї поміщали розчин гліцину (10 мг/мл в РВ) при кімнатній температурі для блокування незв'язаних груп ГА. Через 30 хв поверхню ІСПТ промивали за допомогою РВ. Після іммобілізації білка А на робочу поверхню і неспецифічної сироватки на референтну, наносили специфічні антитіла. Для цього використовували розчин поліклональних антитіл до *Salmonella* (Санкт-Петербург), з розведенням 1:2 у 0,85-ному % розчині NaCl. Розчин антитіл витримували на робочій поверхні протягом 30 хв і далі її промивали РВ. Підготовлений таким чином чіп зберігали у висушеному стані при 4 °С.

Визначення S. typhimurium за допомогою імунного біосенсора на основі ІСПТ. Аналіз здійснювали «сендвіч-методом», для чого протягом 20 хв проводили зв'язування іммобілізованих специфічних антитіл з клітинами *S. typhimurium*, розчиненими у 0,85 %-ному розчині NaCl. Потім їх обробляли протягом 10 хв розчином специфічних антитіл, мічених пероксидазою хрину (ПХ). Активність ПХ реєстрували, використовуючи спеціальний робочий буфер, що включав 5 мМ тріс-НCl (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 15 мМ аскорбінової кислоти і 5 або 10 мМ H₂O₂. Реакція субстрату викликала локальну зміну рН середовища, в результаті утворення дегідроаскорбінової кислоти, що є більш лужною сполукою, порівняно з аскорбіновою кислотою. Сигнали (dV/dt) ІСПТ реєстрували за допомогою електронного пристрою, що забезпечував його підсилення та обробку на основі комп'ютерної програми. Після кожного аналізу чіп обробляли протягом 5 хв розчином 0,1 М НCl та тріс-НCl буфером.

Суспензію автоклавованих клітин *S. Typhimurium*, розчинених у 0,85 %-ному розчині NaCl при концентрації 10⁶ клітин/мл, було отримано від Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок України. Кон'югат специфічних антитіл з ПХ (Biolar, Латвія з RZ=A₄₀₃/A₂₈₀=3,0) було приготовано, використовуючи раніше описану методику [15].

Результати досліджень. Зміна потенціалу ІСПТ при роботі імунного біосенсора як функції від концентрації *Salmonella* в розчині, показана на рис. 1 (середнє значення від 6 – 8 вимірів).

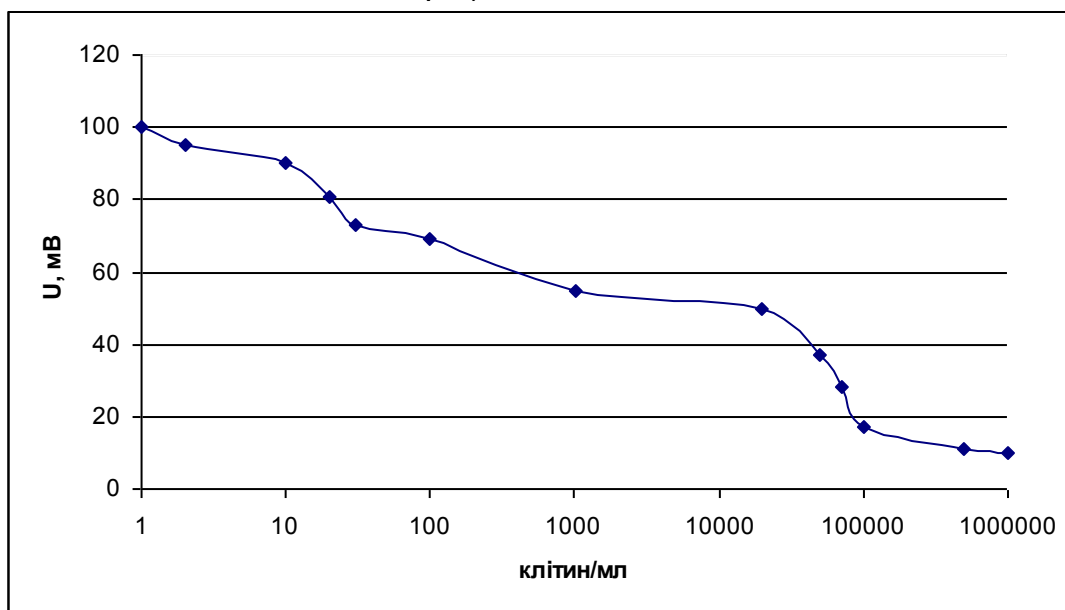


Рис. 1. Крива зміни потенціалу ІСПТ імунного біосенсора при різних концентраціях *Salmonella* в модельних розчинах

Значне зниження сигналу сенсора спостерігалось при концентрації нижче 2,0 – 3,0 клітин/мл *S. typhimurium* в аналізованому розчині. Зазначимо, що відгук біосенсора залежить від кількості антиген-зв'язуючих сайтів на поверхні ІСПТ. Тому орієнтована іммобілізація антитіл за допомогою білка А від *St. aureus* є ефективним методом підвищення сигналу [1]. Лінійне наростання сигналу спостерігалось в межах концентрації сальмонел від 2 до 5×10^5 клітин/мл. У цих межах потенціал ІСПТ змінювався від 95 до 5 мВ. Стандартне відхилення становило в середньому 5 %.

Загальний час проведення аналізу при попередній підготовці поверхні трансдюсера становить близько 30 хв. На наш погляд його можна зменшити вдвічі, особливо, якщо збільшити концентрацію *Salmonella* в досліджуваному зразку до 10 клітин і вище. Іншим підходом зменшення часу аналізу навіть при мінімальній концентрації *Salmonella* є попереднє внесення в аналізований розчин антитіл мічених пероксидазою. Наші експерименти показали, що час проведення аналізу може становити близько 15 – 20 хв без будь-яких змін величини відповіді імунного біосенсора і чутливості аналізу. Руйнування зв'язків антиген-антитіло при обробці біочіпа за допомогою 0.1 М НСІ протягом 5 хв робить можливим повторне використання їх для проведення декількох вимірювань (до 5) без погіршення сигналу. Між вимірюваннями біочіпи зберігали в сухому стані при 4 °С. Перед кожним вимірюванням їх попередньо витримували в РВ протягом години.

Також необхідно відмітити високу відтворюваність результатів з використанням різних ІЧПТ при окремих вимірюваннях. Для досягнення такої відтворюваності нами було використано ІЧПТ з поверхнею СеОх замість Si_3N_4 . Більше того, електричні характеристики трансдюсера і процедура підготовки біологічної мембрани були стандартизовані. В подальшому гостро постало питання очистки та активації поверхні, а також забезпечення постійної вологості

протягом рекомендованого часу зв'язування білка А з активованими групами поверхні.

Нами було проаналізовано неспецифічні відповіді при додаванні робочого буфера або пероксиду водню. З цією метою використовували різні схеми постановки реакції: в першому випадку ІСПТ містив специфічні антитіла, іммобілізовані за допомогою білка А, в другому – неспецифічні антитіла сироватки крові людини наносили на поверхню, вкриту ГА. Було показано (рис. 2), що робочий буфер не впливає на відгук біосенсора, тоді як пероксид водню в концентрації 10 мМ викликав незначний (<10 мВ) відгук. H_2O_2 спричиняє зміну рН середовища в бік кислотної реакції в процесі визначення активності пероксидази хрину. Таким чином, ні робочий буфер, ні пероксид водню, що використовуються при роботі біосенсора суттєво не змінюють базового рівня рН протягом визначення *Salmonella*.

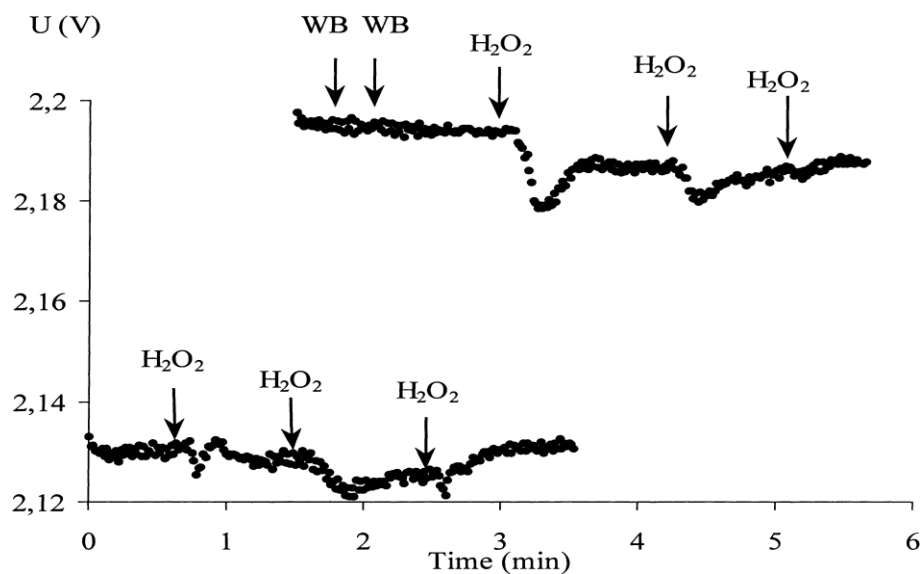


Рис. 2. Неспецифічний відгук сенсора на додавання H_2O_2 і буфера (зміни потенціалу ІСПТ записано як функцію від часу)

Вивчення оптимальної концентрації пероксиду водню показало, що відгук імунного біосенсора був приблизно на 15 – 20 % вище при 10 мМ H_2O_2 , ніж при 5 мМ H_2O_2 .

Порівняння даних з визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах, отриманих нами при використанні оптичного імунобіосенсора і розробленого імунного біосенсора на базі ІСПТ показало, що вони характеризуються майже однаковою чутливістю. Зокрема максимальна чутливість імунного біосенсора на основі ППР сягає близько 5 клітин/мл, а лінійний діапазон відгуку знаходиться в межах 10^1 – 10^7 клітин/мл. Загальний час проведення аналізу становить не більше 30 хв, а біосенсор на базі еліпсометрії повного внутрішнього віддзеркалення (ЕПВВ) відтворює чутливість до 5 клітин на 10 мл.

Необхідно підкреслити, що використання ІСПТ як трансдюсера та електрохімічна реєстрація сигналу є більш відповідним підходом при створенні імунних біосенсорів, що могли б забезпечити дешевший аналіз у порівнянні з тими, що базуються на оптичних принципах (типу ППР і ЕПВВ).

Висновки

Розроблено новий тип імунного біосенсора на основі використання ІСПТ з оксидом церію в підзатворній області для визначення *S. typhimurium*. В основу алгоритму аналізу покладено «сендвіч», або «конкурентний» метод.

У першому випадку іммобілізовані специфічні антитіла реагують з клітинами сальмонел, а потім останні зв'язують такі ж антитіла, але мічені ПХ. Час аналізу значно скорочується при здійсненні «конкурентного» методу, коли одна частина специфічних антитіл попередньо наноситься на поверхні трансдюсера, а інша, мічена ПХ, додається до розчину, що аналізується. Загальний час реакції становив близько 15 – 20 хв. Активність зв'язування ПХ вимірювалася по зміні рН розчину аскорбінової кислоти після додавання пероксиду водню. Максимальна чутливість при визначенні *S. typhimurium* у модельних розчинах становила 2 – 3 клітин/мл, а діапазон чутливості знаходився в межах 5×10^5 клітин/мл.

Для стабілізації сигналу імунного біосенсора і можливості його багаторазового використання, було запропоновано замінити Si_3N_4 на поверхні ІСПТ на CeO_x . Показано можливість використання розробленого імунного біосенсора до 5 разів без зниження сигналу.

Порівняння характеристик імунних біосенсорів на базі ППР та ЕПВВ, розроблених нами раніше [9 – 11, 17, 18] та іншими авторами [5, 7, 12, 19, 22, 23] із запропонованим на основі ІСПТ з CeO_x поверхнею показало, що їх чутливість знаходиться приблизно на одному рівні, але використовуючи останній підхід можна значно здешевити проведення аналізів. Для досягнення чутливості при аналізі наявності сальмонели або інших бактерій на рівні дози інфікування [4] необхідно розробити систему підготовки зразків до аналізу, в тому числі – метод акумуляції клітин у зразку з використанням біоафінних колонок.

Список літератури

1. Биосенсор на основе рН-чувствительных полевых транзисторов для определения глюкозы / Н. Ф. Стародуб, А. В. Ельская, В. А. Поломарчук [и др.] // Электрохимия. – 1989. – Т. 25, №5. – С. 674–675.
2. Зарицкий А. М. Сальмонеллезы / А. М. Зарицкий – К.: Здоров'я, 1988. – 160 с.
3. Antibody immobilization on the metal and silicon surface. The use of self-assembled layer and specific receptors / Starodub N.F., Pirogova L. V., Starodub V. M., Demchenko A. // Bioelectrochemistry. – 2005. V. 66, p. 111-115.
4. Biosensors for detection of pathogenic bacteria / Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E. // Biosensors and Bioelectronics – 1999. 14, p. 599–624.
5. Comparison of the Spreeta surface plasmon resonance sensor and a quartz crystal microbalance for detection of Escherichia coli heatplabile enterotoxin / Spangler B. D., Wilkinson E. A., Murphy J. T., Tyler B. // J. Anal. Chim. Acta. – 2001. v. 444, p. 149–161.
6. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors / Koubova V., Brynda E., Karasova L., Sıkvorc J., Homola J., Dostalek J., Tobisika P., Roslicky J. // Sensors and Actuators. – 2001. v. B74, p. 100-105.
7. Detection of Salmonella enteritidis using a miniature optical surface Plasmon resonance biosensor / Son J. R., Kim G., Kothapalli A., Morgan M.T., Ess D. // J. Physics. – 2007. v. 61, p. 1086-1090.
8. Development of sensor based on the surface plasmon resonance for control of biospecific interaction / Starodub N.F., Dibrova T.L., Shirshov Yu.M., Kostjuevich K.V. // Ukr. Biochem J. – 1999. v. 71, 2, p. 33-37.

9. Express and simple instrumental control of foodborne toxins, viral and microbial infection agents / Starodub N.F., Ogorodniichuk Iu.A., Sitnik Ju. // Abstract book of NATO ARW. – Dnipropetrovsk. 2011. – p. 15.

10. Immune biosensor based on the oxide cerium ISFETs for the determination of mycotoxin level in environmental objects / Starodub N.F., Brezvin O. M. // In Book abstracts of International Conference “LabAutomation 2011”, Palm Springs. – 2011. p. 65.

11. Immune-enzymatic biosensors based on the oxide cerium isfets: some physical and functional characteristics at the determination of somazine and T2-mycotoxin / Starodub N.F., Shmiryeva A. N. // In Book: “The SENSOR+TEST 2011 Conference”. Nuremberg. – 2011. p. 680-685.

12. Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor / Gertie C.A., Bokken M., Corbee R. J., van Knapen F., Bergwerff A. A. // J FEMS Microbiology Letters. – 2003. v. 222, p 75 – 82.

13. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor / Starodub N.F., Dzantiev B.B., Starodub V.M., Zherdev A.V. // Anal. Chim. Acta. – 2000. v. 424, p. 37-43.

14. Immunosensor for the differentiation and detection of Salmonella species based on a quartz crystal microbalance / Wong Y.Y., Ng S.P., Ng N.H., Si S.H., Yao S.Z., Fung Y.S. // Biosensors and Bioelectronics. – 2002. v.17, p. 676-684.

15. Isolation of individual mRNA and immunochemical testing of products of translation / Starodub N.F., Rachkov O.E., Petik A.V., Turkovskaja G.V., Shul'ga N. I., Balkov D.I. // In Proc. “Methods of Mol. Biol.” – K.: Naukova dumka. – 1986. p.90-99.

16. Laboratory diagnostics of salmonellosis, detection of salmonellas in foods and environment / Methodical Guidance. – M.: 2010. – 49p.

17. Methylotrophic yeast microbiosensor based on ionsensitive field effect transistors for methanol and ethanol determination / Korpan Y.I., Soldatkin A.P., Starodub N.F., El'skaya A.V., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Shul'ga A.A. // Anal. Chim. Acta. – 1993. v. 271, p. 203-208.

18. Optical immune biosensor based on SPR for the detection of Salmonella typhimurium / Starodub N.F., Ogorodniichuk Ju. A., Romanov V. O. // In Book: “The Sensor+Test 2011 Conference”. – Nuremberg, 2011. p. 139-144.

19. Optical immune biosensor based on the surface plasmon resonance for the control of level of Salmonella typhimurium in solution / [Starodub N.F., Ogorodniichuk Ju.O., Romanov V.O. Galeljuka I.B., Kushnir I.M.] Sci. Bull., v. 151, ser. “Vet. Med, Quality&Biosafety of Foods”, part 2, 2010. – p. 183-189.

20. Performance of the Spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor / Chinowsky T.M., Quinn J.G., Bartholomew D.U., Kaiser R., Elkind J.L. // Sensors and Actuators. – 2003. v. B91, p. 266–274.

21. Rapid and sensitive biosensor for Salmonella. Biosens / Pathirama S.T., Barbaree J., Chin B.A., Hartell M.G., Neely W.C., Vodyanoy V. // Bioelectron. – 2000. v. 15, p.135-141.

22. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium / Oh B.K., Kim Y.K., Park K.W., Lee W.H., Choi J.W. // Biosensors and Bioelectronics. – 2004. v.19, p. 1497–1504.

23. Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of Salmonella Typhimurium in Chicken Carcass / Lan Yu-bin, Wang Shi-zhou, Yin Yong-guang, Hoffmann W. Clint and Zheng Xian-zhe // J. of Bionic Engineering – 2008. v. 5, Issue 3, p.239-246.

*Предложено новый тип иммунного биосенсора на базе ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ) с пористой поверхностью CeO_x вместо Si_3N_4 , что способствует повышению чувствительности и стабильности анализа. Данный биосенсор использован при определении *Salmonella typhimurium* в модельных растворах. Показано, что чувствительность составляла около 2 – 3 клеток/мл и линейно*

увеличивалась до 5×10^5 клеток/мл. Сделано вывод, что электрохимическая регистрация сигнала с использованием CeO_x пористой поверхности ИСПТ соответствуют требованиям по созданию дешевых иммунных биосенсоров для определения бактериального загрязнения объектов окружающей среды.

Иммунный биосенсор, ионоселективный полевой транзистор, CeO_x пористая поверхность, *Salmonella typhimurium*, модельный раствор.

*A new type of immune biosensor was proposed based on ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) with CeO_x instead of Si_3N_4 gate surface, which promotes the sensitivity and stability of the analysis. This biosensor was used for the determination of *Salmonella typhimurium* in the model solutions. It was demonstrated that the sensitivity of the analysis of salmonella was about 2–3 cells/mL with the maximal response up to 5×10^5 cells/mL. It was concluded that electrochemical signal registration using ISFET based on CeO_x gate surface satisfy the demands of cheap immune biosensor creation for detection of bacterial contamination in the environment.*

Immune biosensor, ion-sensitive field-effect transistor, CeO_x gate surface, *Salmonella typhimurium*, model solution.