



Сторінка молодого вченого

УДК 602.1:53.082.9

© 2015

Н.Ф. Шпирка

*Національний
університет
біоресурсів
і природокористування
України*

** Науковий керівник —
доктор біологічних наук
М.Ф. Стародуб*

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ МОДИФІКАЦІЇ ПОВЕРХНІ БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ІЧПТ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЙОГО ЧУТЛИВОСТІ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ПАТУЛІНУ*

Мета. Установити оптимальні параметри визначення патуліну для підвищення чутливості імунного біосенсора на основі іон-чутливих польових транзисторів (ІЧПТ). **Методи.** Біотехнологічні, біохімічні, імунологічні. **Результати.** Обидва варіанти «конкурентного» способу аналізу свідчать про лінійність зменшення сигналу за концентрації патуліну в діапазоні 1 – 200 нг/мл⁻¹ (у цьому діапазоні потенціал затвору ІЧПТ варіював від 9 до 98 мВ). Деяко більшу чутливість і за трохи розширеного діапазону вимірюваних концентрацій (0,5 – 250 нг/мл) виявлено під час постановки аналізу способом «донасичення». **Висновки.** Установлення оптимальних параметрів роботи такого типу інструментального аналітичного засобу за використання різної концентрації Н₂О₂, та зміни рН показали його неспецифічні відгуки, що істотно не впливають на його роботу.

Ключові слова: патулін, біосенсор, нанопористий церій, іон-чутливий польовий транзистор, рН, Н₂О₂.

Проблема ураження продуктів харчування мікотоксинами має надзвичайно велике значення та набула особливої актуальності у всьому світі. Ці низькомолекулярні сполуки є продуктами життєдіяльності грибів, діють як токсини, канцерогени, а також вирізняються широким спектром поширення у природі. Кількість токсину, що виділяється, залежить від ряду чинників:

- фізичних (вологи, температури та механічних пошкоджень);
- хімічних (наявності діоксиду вуглецю, кисню, пестицидів і фунгіцидів та від особливостей складу субстрату);

- біологічних (сортів рослин, участі комах та ін.) [5].

Волога і температура мають великий вплив на ріст цвілі і продукування мікотоксинів. Патогенні гриби, які уражують культури до збирання врожаю, як правило, потребують вищих рівнів вологості (20–25%), ніж гриби, які розвиваються в кормах під час зберігання (13–18%). Тому більшість кормів з умістом вологи вище 13% сприйнятливі до утворення цвілі і появи мікотоксинів зокрема [7]. Це дає їм змогу вражати продукти харчування та корми для тварин на всіх стадіях вирощування, зберігання і транспортування. Тому,

з одного боку, мікотоксини є небезпечними для здоров'я людини і тварин, а з іншого — їх наявність у кормах має економічні та міжнародні наслідки для торгівлі.

Нині найнебезпечніші гриби роду *Aspergillus*, *Fusarium* і *Penicillium* [4], що продукують основні токсини: зеареленон, охратоксин, афлатоксин та особливо небезпечний мікотоксин — патулін. Міжнародне агентство з вивчення раку на підставі дослідження токсичності патуліну зарахувало його до канцерогенів 3-ї групи, або до речовин, для яких є недостатньо даних для достовірної класифікації [6]. Тому нині потреба контролю та визначення вмісту цього мікотоксину є актуальною проблемою.

Раніше нами було розроблено кілька видів оптичних імунних біосенсорів, а саме: на основі поверхневого плазмонного резонансу та еліпсометрії повного внутрішнього віддзеркалення [3]. Ми намагалися використовувати іон-чутливі польові транзистори (ІЧПТ) як датчик імунного біосенсора. На жаль, стабільність нітриду кремнію на поверхні затвора ІЧПТ не була достатньою для практичного використання біосенсора на основі такої структури. Крім того, для виконання всіх вимог практики щодо високої чутливості аналізу, а також простоти, дешевизни і швидкості його проведення ми запропонували використовувати ІЧПТ на основі оксиду церію [1].

Мета роботи — установлення оптимальних параметрів визначення патуліну для підвищення чутливості імунного біосенсора на основі ІЧПТ.

Матеріали і методи досліджень. Специфічні IgG отримано з Agrisera (Швеція). Їх розчиняли в 0,5 мМ 5 мМ Na-фосфатному буфері (рН 7,3), що містив 100 мМ NaCl (PBS). Специфічні IgG кон'юговано з пероксидазою хрому (ПХ) за стандартами процедури із застосуванням глутарового альдегіду (ГА) [9]. Усі реагенти придбано в «Sigma-Aldrich» (США).

Аналіз на основі ІЧПТ виконано двома способами: «конкурентним» і «донасичення». Перший спосіб проведено за двома варіантами: а) коли специфічні IgG іммобілізували на поверхні затвора, а патулін та його кон'югат з ПХ конкурували за місця зв'язування з ними; б) іммобілізований кон'югат патуліну з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) конкурував за місця зв'язування з вільним токсином за сайти зв'язування зі специфічним IgG, міченим ПХ.

За «донасичення» специфічні IgG іммобілізовано на поверхні затвора і вони спочатку реагували з вільною формою патуліну, після чого взаємодіяли з кон'югатом патулін-ПХ.

Результати та їх обговорення. Для реєстрації зміни рН, що генеруються кон'югатом патуліну з ПХ (0,1 μgml^{-1} , на HRP), специфічні IgG іммобілізували на затворі ІЧПТ [8, 10]. Як поліпшений варіант, специфічні IgG іммобілізували через створення проміжного шару з білка А з *Staphylococcus aureus*. Тоді молекули IgG специфічно зв'язуються з білком А і концентрації специфічних IgG патуліну на поверхні датчика різко збільшується. Для встановлення часу відгуку біосенсора на поверхні затвора ІЧПТ було іммобілізовано ПХ безпосередньо через зшивання з ГА. В обох випадках зсув рН спостерігали через 35–50 с після додавання H_2O_2 .

Установлення оптимальної концентрації H_2O_2 свідчить, що максимального відгуку біосенсора досягнуто за концентрації 10 мМ H_2O_2 . У цьому разі кон'югат патуліну з ПХ пов'язаний з комплексом специфічних IgG з білком А, іммобілізованим на поверхні датчика. Рівень H_2O_2 у робочому буфері (РБ) варіював від 5 до 35 мМ. Концентрація патуліну, міченого ПХ, за «конкурентного» виявлення мікотоксину становила 0,3 мкг/мл⁻¹.

Слід відзначити високу відтворюваність результатів між різними вимірами для окремих ІЧПТ. Для отримання відтворюваності використано однакові пластини ІЧПТ. Більше того, обидві електричні характеристики цих перетворювачів, а також порядок підготовки біологічних мембран стандартизовано. В останньому випадку, це було дуже важливо для виконання точного протоколу підготовки поверхні затвора, а також для забезпечення постійних умов щодо вологості протягом 1 год для взаємодії білка А з активними групами поверхні затвора. Як правило, всі ці процеси виконано технологічною групою, одночасно підготовлено не менше ніж 10 ІЧПТ.

Оскільки ІЧПТ дуже чутливі до різних чинників (складу буферного розчину, іонної сили, рівня рН, опромінення світлом, наявності іонів, що впливають на заряд поверхні затвора, і т.д.), проаналізовано їх неспецифічні відгуки щодо РБ і H_2O_2 . Для цього використано диференційну схему: один ІЧПТ містив специфічні IgG, іммобілізовані через білок А, другий — у разі іммобілізації БСА через ГА. У результаті

досліджень встановлено, що РБ не впливав на відгук датчика, тоді, як H_2O_2 у концентрації 10 мМ ініціювала невеликий (~10 мВ) відгук. Під час визначення активності ПХ H_2O_2 викликала кислий зсув рН без основних змін параметрів. Отже, ні РБ, ні H_2O_2 не сприяли зміщенню основного значення рН під час визначення патуліну. За обох варіантів «конкурентного» способу аналізу

лінійність зменшення сигналу спостерігалася за концентрації патуліну $1\text{--}200\text{ нг/мл}^{-1}$ (у цьому діапазоні потенціал затвору ІЧПТ варіював від 9 до 98 мВ). Дещо більшу чутливість і за трохи розширеного діапазону вимірюваних концентрацій (0,5–250 нг/мл) виявлено під час постановки аналізу способом «донасичення». Стандартне відхилення в середньому становило близько 5%.

Висновки

Виявлені зміни рН, які генеруються кон'югатом патулін-HRP, установлення оптимальної концентрації H_2O_2 , що істотно не впливає на зсув відгуку біосенсора, а також оптимізація ряду інших

параметрів постановки аналізу дали змогу здійснювати детекцію патуліну в діапазоні $1\text{--}200\text{ нг/мл}^{-1}$ та $0,5\text{--}250\text{ нг/мл}$, залежно від вибраного способу проведення аналізу.

Бібліографія

1. Сlišик Н.Ф. Імунний біосенсор на основі ISFETs з оксид церієвою чутливою поверхнею для визначення патуліну//Н.Ф.Сlišик, М.Ф. Стародуб//Наук. доп. НУБіП України. — 2014. — № 5.
2. Biosensors for the control of some toxins, viral and microbial infections to prevent actions of bioterrorists// N.F. Starodub, Ju.O. Ogorodnijchuk, Ju.O. Sitnik, N.F. Slišik// Portable Sensors for the Rapid Determination of Chemical and Biological Agents and other Weapons of Terrorism. — Ser. B — Physics and Biophysics, 2011. — P. 95–117.
3. Biosensors for the Determination of Mycotoxins: development, efficiency at the analysis of model samples and in case of the practical applications// Lecture Notes of the ICB/N. Starodub, I. Pylypenko, L. Pylypenko et al. — 2010. — V. 86. — P. 81–101.
4. Cole R.J. Handbook of Secondary Fungal Metabolites// R.J. Cole, M.A. Schweikert, B.B. Jarvis, 2003. — V. I–III. Academic Press: San Diego, USA. — P. 1–672.
5. Frisvad J.C. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage//J.C. Frisvad, D.S. Jayas, N.D.G. White, W.E. Muir (Eds.)//Stored-Grain Ecosystems. Marcel Dekker, Inc. — New York, 1995. — P. 251–288.
6. IECFA toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food: patulin//Forty-fours meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives, 1996. WHO Food Additives. — Ser. 35. — 377 p.
7. Magan N. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies//N. Magan//Mycopathologia, 2006. — V. 162. — P. 245–253.
8. Moake M.M. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety//M.M. Moake, O.I. Padilla-Zakour, R.W. Worobo. — 2005. — 4. — P. 8–21.
9. Starodub N.F. Proc. of Methods of Mol. Biol./ N.F. Starodub, A.E. Rachkov, A.V. Petik. — 1986. — P. 90–99.
10. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 (FAO food and nutrition paper 81). — 165 p.

Надійшла 8.04.2015.