



Сторінка молодого вченого

УДК 602.1:53.082.9:579.842.14

© 2016

Ю.О. Огороднійчук

*Національний
університет біоресурсів
і природокористування
України*

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

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ОПТИЧНИХ І ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНИХ ІМУНОБІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM**

Мета. Проаналізувати ефективність розроблених оптичних і потенціометричних імунобіосенсорів на основі явищ поверхневого плазмонного резонансу (ППР), еліпсометрії повного внутрішнього відбиття (ЕПВВ) та іонселективних польових транзисторів (ІсПТ) для визначення *Salmonella typhimurium* у модельних розчинах. **Методи.** Модифікована методика на основі реакції антиген-антитіло, яка включала обробку трансдюсерів білком А для створення орієнтованого шару антитіл.

Результати. Чутливість ППР-імунобіосенсорів становила $10^1 - 10^7$ кл./мл, біосенсора на основі ЕПВВ — менше 5 кл. в 10 мл, ІсПТ-імунобіосенсора — від 2 до $5 \cdot 10^5$ кл./мл.

Висновки. Проаналізовані імунобіосенсори є ефективними під час визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах. Найвищу чутливість, що відповідає практичним вимогам, має оптичний імунобіосенсор на основі ЕПВВ. У ІсПТ-імунобіосенсора чутливість дещо нижча, але він вирізняється стабільністю і високою відтворюваністю результатів. Імунобіосенсори на основі явища ППР забезпечують швидкий аналіз у реальному часі та не потребують спеціального персоналу, тому їх можна використовувати для первинної експрес-діагностики *S. typhimurium*.

Ключові слова: імунобіосенсор, реакція антиген-антитіло, *Salmonella typhimurium*.

Salmonella typhimurium, поряд з іншими представниками роду *Salmonella*, є одним з біологічних агентів, що найчастіше викликає харчові токсикоінфекції. Причиною заражень можуть бути харчові продукти (м'ясо, яйця та ін.), контаміновані

живими мікроорганізмами [1], які небезпечні для здоров'я людини і завдають значної шкоди харчовій промисловості та сільському господарству. Оскільки більшість відомих нині методів визначення мікроорганізмів не повністю задовольняють практичні вимоги

через їх недостатню чутливість, тривалість виконання та/або високу вартість аналізу, актуальним є питання розробки нових високочутливих підходів для виявлення патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі. Біосенсори — аналітичні прилади, що мають в основі біологічний чутливий елемент (ліганд), поєднаний з фізико-хімічним трансдюсером або перетворювальною мікросистемою для відтворення сигналу. Його величина виникає пропорційно концентрації аналіту і постулюється як альтернативна технологія експресного визначення мікроорганізмів [4, 7].

Мета досліджень — проаналізувати ефективність використання розроблених оптичних і потенціометричних імунобіосенсорів для визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах з можливістю їх подальшого використання для виявлення джерел інфікування тварин та людини, експресного контролю якості кормів та готової сільськогосподарської продукції.

Матеріали і методи досліджень. Для визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах за допомогою різних типів біосенсорів використовували модифіковану методику на основі реакції антиген-антитіло, яка включала попередню підготовку трансдюсерів для підвищення чутливості та рівня визначення біосенсорів.

У разі визначення *S. typhimurium* за допомогою оптичних імунобіосенсорів використовували біосенсор на основі модуля Spreeta (США) і прилад «Плазмонотест» (розробка Інституту кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України, патент UA 100934), в основі роботи яких лежить явище поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [5, 9], та прилад, розроблений на основі еліпсометрії повного внутрішнього відбиття (ЕПВВ) [10]. У цих випадках використовували прямий метод аналізу, що зумовлено специфікою роботи трансдюсерів імунобіосенсорів. Здійснювали попередню модифікацію поверхні трансдюсерів поліаліламідом гідрохлоридом (ПАА) та білком А від *Staphylococcus aureus*. Для уникнення явища неспецифічного зв'язування антигену (Ag) з поверхнею трансдюсера наносили бичачий сироватковий альбумін для блокування вільних ділянок на поверхні золота. За використання біосенсора на основі ЕПВВ підготовку трансдюсера здійснювали за тією самою методикою, що і для ППР-біосенсорів.

Проаналізовано можливість використання нового типу імунного біосенсора на основі іонселективних польових транзисторів (ІсПТ) [2] з пористою поверхнею CeOx замість Si_3N_4 для визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах. Попередня підготовка трансдюсера включала: активацію поверхні за допомогою водного розчину глутаральдегіду (ГА) та нанесення білка А від *St. aureus*. Наступний крок — іммобілізація поліклональних антитіл, специфічних до *S. typhimurium*. Вільні місця на поверхні трансдюсера блокували за допомогою неспецифічної сироватки крові людини, а блокування незв'язаних груп ГА здійснювали нанесенням розчину гліцину. Підготовлений у такий спосіб чіп зберігали у висушеному стані за 4°C . Аналіз здійснювали «сендвіч-методом», для чого протягом 20 хв проводили зв'язування іммобілізованих специфічних антитіл з клітинами *S. typhimurium*, що були у фізіологічному розчині. Іммобілізовані у такий спосіб клітини обробляли протягом 10 хв розчином специфічних антитіл, мічених пероксидазою хрину.

Результати та їх обговорення. За визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах з використанням модуля Spreeta рівень чутливості аналізу становив $10^3 - 10^7$ кл./мл. Чутливість імунобіосенсора на основі «Плазмонотест» була дещо вищою — у межах $10^1 - 10^6$ кл./мл. Доведено, що на рівень чутливості приладів значною мірою впливає попередня підготовка робочої поверхні, метою якої є створення орієнтованого шару антитіл. У результаті фізичної адсорбції антитіл безпосередньо на золотій поверхні трансдюсера біосенсора «Плазмонотест» чутливість аналізу становила $10^4 - 10^6$ кл./мл. Максимальний рівень чутливості біосенсора на основі ЕПВВ сягав кількох клітин (менше 5) у 10 мл. Оскільки тривалість іммобілізації кожного реактиву на поверхню трансдюсера становить у середньому 10 хв, тривалість повного циклу аналізу — менше 1 год. Цей час можна значно скоротити, якщо використовувати чіпи з попередньо іммобілізованими ПАА, білком А та специфічними антитілами. Для порівняння, метод твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА) забезпечує визначення *S. typhimurium* на рівні 10^4 кл./мл [8], 10^6 кл./мл [6] за загальної тривалості аналізу від 6 год.

За використання ІсПТ-імунобіосенсора лінійне наростання сигналу спостерігалося в межах концентрації сальмонел від 2

до $5 \cdot 10^5$ кл./мл. У цьому разі відгук біосенсора також залежить від кількості антиген-зв'язувальних сайтів на поверхні ІсПТ, тому орієнтована іммобілізація антитіл за допомогою білка А від *St. aureus* є ефективним методом підвищення сигналу. Загальний час проведення аналізу за попередньої підготовки поверхні трансдюсера становить близько 30 хв. Руйнування зв'язків антиген-антитіло

за обробки біочіпу за допомогою 0,1 М НСІ протягом 5 хв робить можливим його повторне використання для проведення кількох вимірювань (до 5) без погіршення сигналу. Використання методу акумуляції клітин у зразку (за допомогою біоафінних колонок або методу розділення клітин за допомогою магнітних частинок) дає змогу підвищити чутливість до рівня дози інфікування [3].

Висновки

Проаналізовані імунобіосенсори є ефективними під час визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах. Найвищу чутливість, на рівні кількох клітин (менше 5) у 10 мл має оптичний імунобіосенсор на основі ЕПВВ. Така чутливість відповідає практичним вимогам, оскільки для питної води інфекційна доза становить 1 кл./л. Імунобіосенсор на основі ІсПТ хоч і має дещо нижчу чутливість ($2-5 \cdot 10^5$ кл./мл), але відрізняється стабільністю і високою відтворюваністю результатів. Додатковою перевагою методу

є можливість багаторазового використання робочої поверхні (до 5 циклів аналізу, без втрати чутливості біосенсора), що значно зменшує вартість аналізу. Оптичні ППР-імунобіосенсори мають чутливість у межах 10^1-10^7 кл./мл, що є вищою чутливістю методу ТІФА. Водночас вони забезпечують швидкий аналіз у реальному часі та не потребують спеціального персоналу. Такі переваги роблять можливим використання цих імунобіосенсорів для проведення первинної експрес-діагностики *S. typhimurium*.

Бібліографія

1. Зарицкий А.М. Сальмонеллезы/А.М. Зарицкий. — К.: Здоров'я, 1988. — 160 с.
2. Тернер Э. Биосенсоры: основы и приложения; пер. с англ.; под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. — 614 с.
3. Biosensors for detection of pathogenic bacteria/ D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins//Biosensors & Bioelectronics. — 1999. — V. 14. — P. 599–624.
4. Biosensors: A Novel Approach for Pathogen Detection/R. Syam, K.J. Davis, M.D. Pratheesh [et al.]//VETSCAN. — 2012. — V. 7 (1). — P. 14–18.
5. Detection of Salmonella enteritidis using a miniature optical surface Plasmon resonance biosensor/J.R. Son, G. Kim, A. Kothapalli [et al.]// J. Physics. — 2007. — V. 61. — P. 1086–1090.
6. Development of indirect competitive ELISA for the detection of Salmonella typhimurium/J. Bang, S. Shukla, Y. Kim, M. Kim//Romanian Biotechnological Letters. — 2012. — V. 17 (2). — P. 7194–7204.
7. Lazcka O. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors/O. Lazcka, F. Javier Del Campo, F. Xavier Munoz//Biosensors and Bioelectronics. — 2007. — V. 22. — P. 1205–1217.
8. Prusak-Sochaczewski E. An improved ELISA method for the detection of Salmonella typhimurium/ E. Prusak-Sochaczewski, J.H.T. Luong//J. Appl. Microbiology. — 1989. — V. 66 (12). — P. 127–135.
9. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium/B.K. Oh, Y.K. Kim, K.W. Park [et al.]//Biosensors and Bioelectronics. — 2004. — V. 19. — P. 1497–1504.
10. The label free detection of aflatoxin using ellipsometry immunosensor/A. Nabok, M.K. Mustafa, A. Tsargorodskaya, N.F. Starodub//Bioanalytical Chem. Manuscript ID: ac-2010-003739, 2010. — 15 p.

Надійшла 17.09.2015.