

УДК 54.066

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ И
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ С ПРИМЕНЕНИЕ ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫМИ СЛОЯМИ**

Стекольщикова А.А., Николаев К.Г.

aastekolshchikova@itmo.ru

Научный руководитель – к.х.н., профессор, директор НОЦ инфохимии Скорб Е.В.

(«Национальный исследовательский университет ИТМО»)

Аннотация. Создание простых и надежных способов определения патогенных микроорганизмов и вирусов стимулируется в настоящее время потребностями не только клинической медицины, но и представляет значимость для пищевой промышленности, ветеринарии, контроля объектов окружающей среды. Значительный интерес представляет создание иммуноферментных сенсоров с электрохимическим детектированием степени протекания биоспецифических реакций, поскольку подобные аналитические устройства обладают высокой точностью и экспрессностью, и в тоже время, отличаются относительно невысокой стоимостью и простотой выполнения определений.

Предупреждение и предотвращение инфекционных заболеваний состоит в тщательном контроле различных видов патогенных бактерий и вирусов. Зачастую присутствие незначительного количества возбудителей в организме представляет опасность, следовательно, для эффективного определения бактерий и вирусов требуется разработка экспрессных и чувствительных методов анализа.

Большинство из наиболее часто используемых традиционных способов определения бактериальных патогенов и вирусов, вследствие их длительности, трудоемкости, недостаточной чувствительности не всегда позволяют провести анализ в желаемом масштабе времени. Весьма перспективным в этом плане может оказаться разработка аналитических устройств, основанных на сочетании принципов биокаталитических и иммунохимических взаимодействий, поскольку комбинация каталитических свойств фермента, уникальной специфичности антител позволяет проводить чувствительное и селективное определение патогенных микроорганизмов.

С учетом этих соображений в работе разрабатываются электрохимические иммуносенсоры для обнаружения вирусного генетического материала и бактериальных патогенов, которые могут быть выполнены с помощью простых инструментов. Электрохимические иммуносенсоры — это тип датчиков, которые обеспечивают селективную количественную или полуколичественную аналитическую информацию с помощью специфической биохимической реакции между антителом (АВ) и антигеном (АГ). Благодаря стабильному и специфическому связыванию между этими биомолекулами электрохимические иммуносенсоры характеризуются высокой селективностью и чувствительностью.

Описанная в данной работе система сочетает в себе преимущества оптического иммуноферментного анализа и электрохимических методов. По сравнению с традиционными оптическими иммуноанализами электрохимические иммуносенсоры характеризуются простотой, быстродействием, низкой стоимостью, портативностью и простотой в использовании контрольно-измерительных приборов, широкими возможностями миниатюризации и непрерывного мониторинга в режиме реального времени, а также удобством использования для мультисенсорного анализа.

Подходящая иммобилизация биопознавательного элемента, такого как антитело на поверхности электрода имеет важное значение для разработки чувствительных и аналитически надежных иммуносенсоров.

Существуют различные стратегии функционализации антител для специфического, количественного обнаружения антигена. Однако современные методы имеют ряд недостатков, включая низкую первичную адсорбцию антител, низкую эффективность

блокирования и необходимость выполнения сложных, многократных этапов. На основании вышеизложенного анализа мы выдвинули гипотезу о том, что полиэлектролитные мультислои могут быть использованы для контроля адсорбции антител и антигенов на каждом этапе сборки электрохимических иммуносенсоров, что приводит к повышению чувствительности иммуноанализа. Полиэлектролиты могут быть нанесены на субстрат любой морфологии с помощью метода послойного наслаивания. Полиэлектролиты обладают значительными преимуществами перед ковалентной сшивкой, связанной с эффективным контролем адсорбции белка, а также созданием псевдогомогенной системы на поверхности электрода, которая приводит к увеличению подвижности антител для связывания с антигенами определенными Fab фрагментами. Полиэлектролиты увеличивают константу связывания комплекса антитело-антиген, что приводит к увеличению чувствительности анализа. В оптимизированных условиях и при выборе наилучшей архитектуры, на примере модельного вируса клещевого энцефалита, тестировались различные концентрации антигена вируса для построения градуировочной зависимости. Для обнаружения вирусов использовали иммуносенсор сэндвич-типа, состоящий из немеченого первичного захватывающего антитела и электрохимически детектируемого редокс-активного конъюгированного с меткой сигнального вторичного антитела. При связывании специфического антигена и следующего сигнального антитела обнаруживается увеличение или уменьшение тока редокс-активной молекулы.

В работе был разработан новый и быстрый способ электрохимического иммуноанализа с использованием простой и надежной системы на основе печатных электродов, модифицированных полиэлектролитными слоями с трафаретной печатью. Работа демонстрирует разработку более простого и быстрого протокола функционализации электродов по сравнению с ранее представленными работами без ущерба для аналитических характеристик. Градуировочные кривые определения антигена с помощью модифицированных полиэлектролитами сенсоров имели широкий диапазон концентраций от 10^3 до 10^9 частиц/мл. Аликвота антигенов для анализа составляла 5 мкл, что означает абсолютный предел обнаружения 5 частиц/мл. В этом исследовании было обнаружено, что полиэлектролиты эффективно улучшают чувствительность иммуносенсоров по сравнению с модифицированным только антителами электродом. Полиэлектролиты не только упрощали процесс блокировки поверхности для создания более удобного процесса иммуноанализа, но и, что более важно, подавляли неспецифическую адсорбцию белка, уменьшая величину шумового сигнала даже при отсутствии стадии адсорбции блокирующего реагента. Полиэлектролиты увеличивали первичную адсорбцию антител на субстрате, и константу связывания комплекса антитело-антиген, тем самым увеличивая чувствительность анализа.

Электрохимический иммуносенсор, разработанный по простому протоколу функционализации, может быть использован для обнаружения других клинически значимых биомаркеров для удовлетворения потребностей клинической диагностики.