УДК 619:579 : 612.017 : 616-091.3

НОВГОРОДОВА О. Ю., наук. співробітник
СТАРОДУБ М. Ф., д-р біол. наук
УШКАЛОВ В. О., д-р вет. наук
ОГОРОДНІЙЧУК Ю. О., наук. співробітник
Національний університет біоресурсів і природокористування України
oleksandra_n@yahoo.com; nikstarodub@yahoo.com; ushkalov63@gmail.com

МОДИФІКАЦІЯ ПОВЕРХНІ ІМУНОСЕНСОРА ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ АНТИТІЛ

Проаналізовано ефективність іммобілізації антибактеріальних антитіл на поверхні трансдюсера, вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами і похідними декстрану) для створення функціонально стабільних уніфікованих чутливих елементів оптичного імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу. Показано, що використання поліелектролітів поліаліламіну гідрохлориду і полістиренсульфонату для модифікації поверхні перетворювача біосенсора є найбільш доцільним, дешевим і простим під час проведення скринінгових досліджень. Змінні пластинки, які використовують як біочипи, можуть бути підготовлені заздалегідь і використані в разі потреби.

Ключові слова: бактерії, P. *aeruginosa, S. typhimurium*, імуносенсор, трансдюсер, поліелектроліт, біочип, поверхневий плазмонний резонанс.

Постановка проблеми. У попередніх дослідженнях була показана ефективність імунного біосенсора на основі ППР для реєстрації специфічної взаємодії антиген–антитіло, а також доведена можливість його використання для експресного визначення *P. aeruginosa* або *S. typhimurium*. Для цього на поверхню трансдюсера іммобілізували антибактеріальні антитіла. Іммобілізація антитіл на золотій поверхні забезпечувала селективне зв'язування із антигеном бактеріальної культури *P. aeruginosa* або *S. typhimurium*.

Виявилось, що результати аналізу істотно залежать від того, яким чином підготовлено шар золота на скляній поверхні, у який спосіб цю поверхню попередньо обробляли та який стан іммобілізованого біологічного матеріалу на поверхні трансдюсера.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Нанесення на поверхню золота різних покриттів дозволяє збільшити чутливість імуносенсора. Зокрема, модифікація сенсорної поверхні додекантіолом збільшує її в 1,3 рази [4]. Окрім того, у разі іммобілізації біологічних молекул звичайною фізичною адсорбцією на чистій поверхні золота або ж попередньо обробленій додекантіолом чи поліелектролітами [4, 5] досить значна частина їх може бути блокована внаслідок контакту активних центрів (наприклад, антигензв'язувальних сайтів) з поверхнею. Аби уникнути цього недоліку, використовують різні підходи, серед яких найпоширенішими є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки Ленгмюр-Блоджет різного складу [6] або попередня іммобілізація на поверхні білка А із *Staphylococcus aureus* [5] та лектинів [7, 8], що мають спорідненість до Fc фрагмента IgG або ж до його карбогідратного компонента [9]. У наших дослідженнях особливу увагу приділяли саме оптимізації умов іммобілізації селективного біологічного матеріалу [10, 11, 12, 13, 14, 15].

У цій роботі наведено експериментальні дані щодо порівняльного використання поліелектролітів, тіолів та похідних декстрану для іммобілізації антибактеріальних антитіл з метою забезпечення ефективності процесу та функціональної стабільності підготовленої поверхні трансдюсера.

Мета досліджень – дослідити використання поліелектролітів, тіолів та похідних декстрану для іммобілізації антибактеріальних антитіл на поверхні трансдюсера.

Матеріал та методика досліджень. Для проведення досліджень використовували вимірювальний пристрій імуносенсор «Плазмон-6» на основі поверхневого плазмонного резонансу. Трансдюсер імуносенсора у вигляді попередньо хромованої (3–5 нм шару Cr) скляної пластинки з напиленим шаром золота товщиною 45 нм поєднується з призмою оптичного приладу за допомогою імерсійної рідини (поліфенілового ефіру) з коефіцієнтом заломлення 1,6.

Для досліджень імунним біосенсором на основі ППР готували різні розведення антитіл у 1 мМ трис HCl буфері, pH 7,4, що містив 140 мМ хлористого натрію (ЗФР). 1 % розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА), отриманого від фірми Sigma (США), готували, використовуючи ЗФР.

© **Новгородова О. Ю., Стародуб М. Ф., Ушкалов В. О., Огороднійчук Ю. О., 2017.**

Для модифікації поверхні трансдюсера застосовували додекантіол, білок А *Staphylococcus aureus*. та поліелектроліти: поліаліламін гідрохлорид (ПАА) та полістирен сульфат (ПСС). Хімічну сорбцію додекантіолу HS (CH2)11CH3 здійснювали, занурюючи виготовлену пластинку з нанесеним шаром золота в 1 мМ розчин етанолу за кімнатної температури на 15 год, після чого промивали чистим етанолом і висушували у потоці повітря. Поліелектролітна нерозчинна плівка на поверхні золота формувалась за допомогою поліаліламіну гідрохлориду (ПАА). Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/см^3, час експозиції 30 хв, за кімнатної температури. Поверхню промивали дистильованою водою.

У разі застосування декстрану сульфату (5 kDa) його розчин в 1 мМ трис HCl буфері, pH 4,0, концентрація 2 мг/см^3, наносили на поверхню і витримували 25 хв, а потім поверхню промивали буфером.

Розчин білка А *Staphylococcus aureus* було приготовано в трис HCl буфері (pH 7,4) концентрацією 1 мг/мл. Нанесення здійснювали протягом 30 хв за температури 25 ^{o}C, після чого промивали комірки 0,9 % фізіологічним розчином (ФР).

Тестування *P. aeruginosa* та *S. typhimurium* проводили як описано раніше [6, 7, 8, 12, 13].

Основні результати дослідження. Важливою вимогою до роботи імуносенсора є стабільність і відтворюваність результатів досліджень. Тому одним з основних завдань, які мають бути вирішені за впровадження у практику розробленого нами раніше [8,12] імунобіосенсорного методу експрес-індикації патогенних бактерій, є забезпечення ефективної стандартизованої іммобілізації біологічного матеріалу та оптимізація функціональних параметрів імуносенсора на основі ППР.

Оскільки чутливість ППР біосенсора досить висока й достатня для проведення скринінгових експресних досліджень на *P. aeruginosa*, то для інтеграції антитіл на поверхні трансдюсера користувались способами, що були найпростішими і забезпечували високу ефективність.

У спеціальній серії досліджень [6, 7] доведено, що адсорбція антитіл на поверхні біочипу, вкритій шаром додекантіолу або поліелектроліту ПАА, є стабільною в часі й не руйнується за промивання вимірювальної комірки ЗФР. Іммобілізація антитіл супроводжується зміною резонансного кута в межах 1700–1900 кут. с. Водночас показано, що в разі використання поліелектроліту кількість сорбованого на поверхні антигену була дещо більшою, а відгук біосенсора за іммобілізації антигену був більш стабільним і відтворюваним порівняно з необробленою поверхнею, хоча достовірного підвищення концентрації антибактеріальних антитіл на поверхні не спостерігалось (рис. 1).

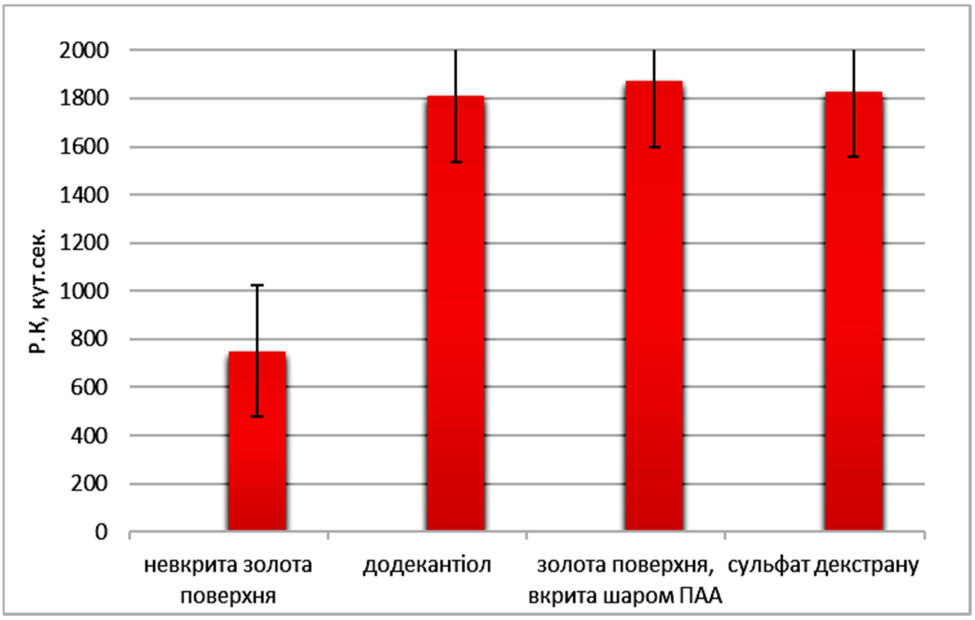

Рис. 1. **Відгук ППР біосенсора на внесення розчину антитіл до *P. aeruginosa* за використання різних варіантів чутливої поверхні:** 1 – невкрите золото, 2 – додекантіол, 3 – золото, вкрите шаром ПАА, 4 – сульфат декстрану.

Застосування додекантіолу також сприяє стабілізації моношару антибактеріальних антитіл (рис. 2).

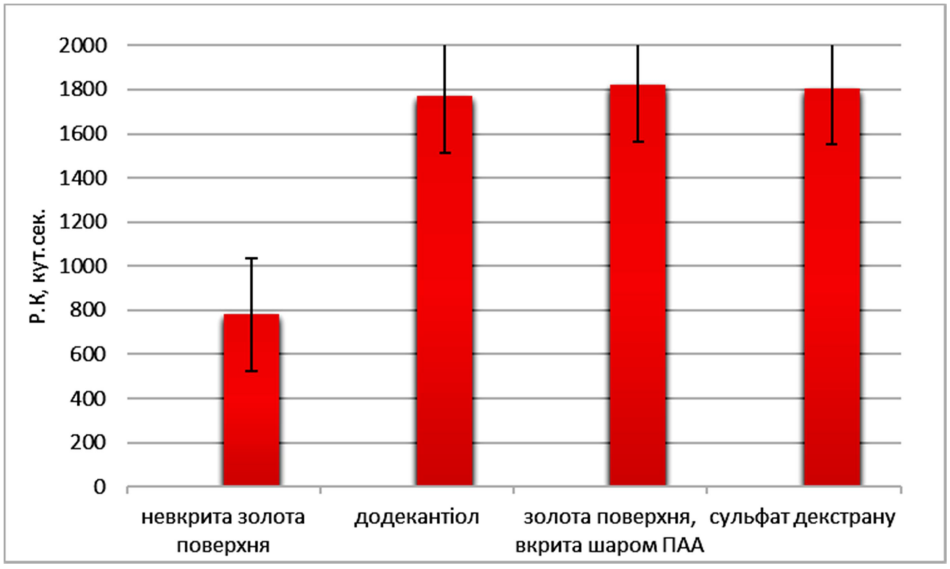

Рис. 2. **Відгук ППР біосенсора на внесення розчину антитіл до *S. typhimurium* за використання різних варіантів чутливої поверхні:** 1 – невкрите золото, 2 – додекантіол, 3 – золото, вкрите шаром ПАА, 4 – сульфат декстрану.

Іммобілізовані таким методом антитіла зберігали майже стовідсоткову активність упродовж 3 місяців, тоді як антитіла, нанесені на невкриту поверхню (шляхом фізичної сорбції), втрачали активність вже через 2–3 тижні.

Оброблення поверхні 1 % розчином БСА після сорбції антигену не вносить суттєвих змін у величину резонансного кута, що реєструється. Це, на нашу думку, означає, що на поверхні практично не залишається вільних місць зв'язування, а концентрація антитіл є достатньою для створення максимально щільного шару. Із введенням у вимірювальну комірку специфічної бактеріальної культури *P. aeruginosa*, величина відгуку біосенсора корелює зі ступенем її розведення. Таким чином, іммобілізація антитіл забезпечує селективне зв'язування специфічних антитіл із сироватки крові тварин. Утворення на поверхні біочипа імунних комплексів спричинює зсув резонансного кута, пропорційний кількості антитіл у пробі.

Показано, що нанесення антигену на поверхню позитивно зарядженої поліелектролітної плівки підвищує відгук біосенсора на 15–20 % порівняно з необробленою поверхнею біосенсорного перетворювача (рис. 2).

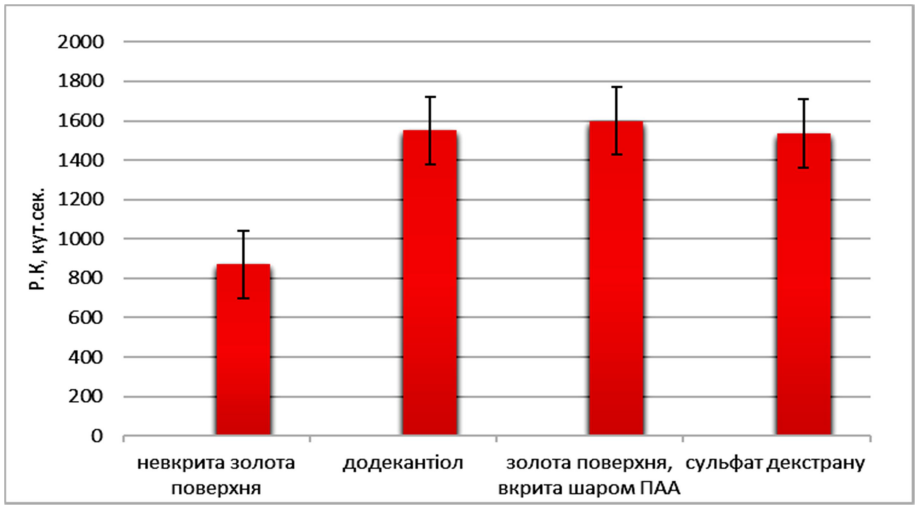

Рис. 3. **Відгук ППР біосенсора на внесення розчину антигену до *P. aeruginosa* в концентрації 10 кл/см ^{3} за використання різних варіантів чутливої поверхні:** 1 –невкрите золото, 2 – додекантіол, 3 – золото, вкрите шаром ПАА, 4 – сульфат декстрану.

Встановлено, що модифікація трансдюсерної поверхні тіолами майже не впливає на чутливість аналізу, тобто відгук імуносенсора під час визначення інтенсивності його специфічної імунної взаємодії з антитілами, що містились у сироватці крові, є приблизно таким, як і без попереднього застосування тіолів.

Це зумовлено лише тим, що орієнтація антитільних детермінант на золотій поверхні трансдюсера не сприяє їх максимальній експозиції як у разі, коли попередньо наносили поліелектролітний шар. Водночас, така модифікація стабілізує адсорбцію антигену, підвищуючи також відтворюваність результатів аналізів. Розбіжність результатів під час вимірювання однієї проби значно менша порівняно з випадком, коли антитіла іммобілізували безпосередньо на поверхні золота. Таким чином, показано, що застосування додекантіолу та поліелектроліту ПАА для покриття шару золота на поверхні перетворювача дозволяє, передусім, підвищити відтворюваність роботи чутливих елементів оптичного імунного біосенсора на основні ППР (рис. 3).

Проте кількість біологічних молекул фіксованих на поверхні фізичною сорбцією або за допомогою проміжних шарів зазначених вище сполук, обмежена площиною поверхні перетворювача. Цьому обмеженню можна запобігти за допомогою сполук, які здатні формувати на поверхні розгалужені структури і в такий спосіб забезпечувати розташування біологічного матеріалу у тривимірному просторі. Таким чином кількість іммобілізованого матеріалу можна збільшити, підвищивши тим самим чутливість імуносенсора (рис. 4, 5).

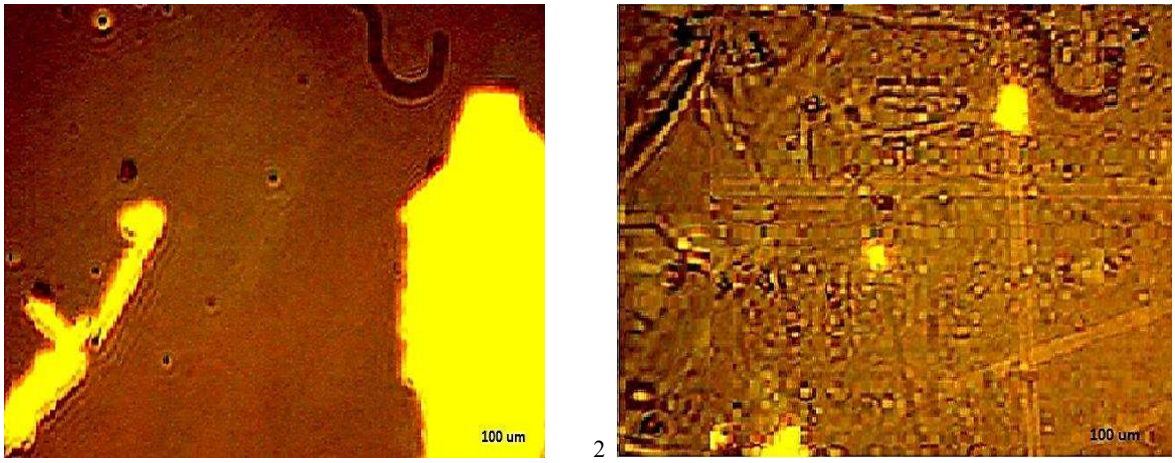

Рис. 4. **Вигляд поверхні трансдюсера:** 1 – невкрита золота поверхня,
2 – поверхня, модифікована ПАА із нанесеним шаром антитіл до *P. Aeruginosa.*

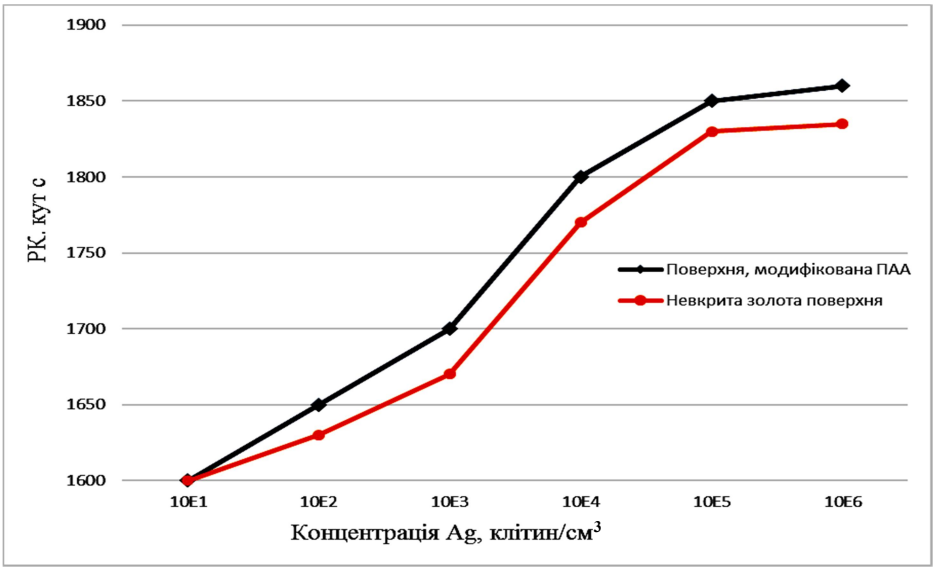

Рис. 5. **Величина відхилення резонансного кута імунного сенсора на основі ППР під час дослідження антигену *P.aeruginosa.***

Нами запропоновано ще одну схему застосування поліелектролітів, коли полікатіони та поліаніони використовувались для формування подвійного розгалуженого шару біомолекул.

Така схема іммобілізації біологічного матеріалу була спочатку відпрацьована на традиційній моделі антиген–антитіло: специфічний щодо *P. aeruginosa* IgG кролика як антитіло та бактеріальна суспензія *P. aeruginosa* як антиген.

IgG специфічний щодо *P. aeruginosa* в ЗФР, pH 8,0, адсорбували спонтанною фізичною сорбцією на поверхні перетворювача, інкубували 30 хв за кімнатної температури, після чого комірку промивали ЗФР.

Потім у комірку вносили розчин поліелектролітів у послідовності ПАА – ПСС – ПАА. Концентрація кожного поліелектроліту становила 1 мг/ см^3, час інкубації – 20 хв. Далі у комірку знову вносили антитіла кроля до антигену *P. aeruginosa* в концентрації 10^3 кл/ см^3, витримували 20 хв і промивали ЗФР. Потім у комірку додавали 0,5 % глутарового альдегіду. Після інкубації протягом 10 хв поліелектроліти вимивали 0,01 М трис HCl буфером, змінюючи pH від 4,0 до 8,0 і руйнуючи електростатичні зв'язки між IgG та поліелектролітами. Таким чином, на поверхні перетворювача формується не моношар, а подвійний шар антитіл за рахунок ковалентних зв'язків між молекулами IgG, утворених за допомогою глутарового альдегіду. Насамкінець у комірку вносили розчин антигену *P. aeruginosa* в діапазоні концентрацій від 10 до 1000 кл/см^3 у ЗФР та фіксували відгук імуносенсора (рис. 6). Зміщення резонансного кута було пропорційне концентрації IgG *P. aeruginosa* у розчині.

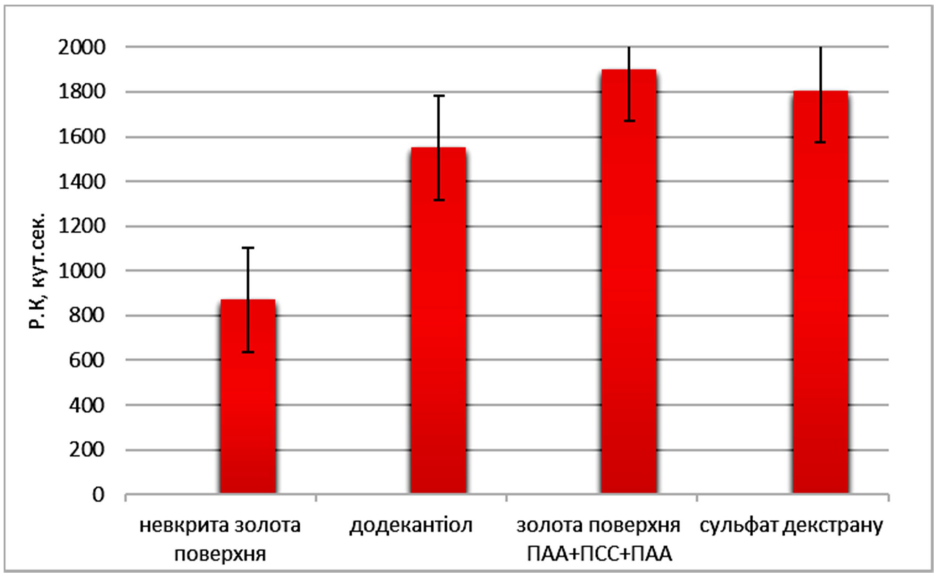

Рис. 6. **Відгук ППР біосенсора на внесення розчину антигену до *P. aeruginosa* в концентрації 10 кл/см^3 за використання різних варіантів чутливої поверхні:**
1 – невкрите золото, 2 – додекантіол, 3 – золото, вкрите шаром ПАА+ПСС+ПАА, 4 – сульфат декстрану.

Показано, що підготовка чутливої поверхні у такий спосіб дозволяє значно підвищити чутливість аналізу, яка в даному разі становила 10 кл/см^3, причому лінійний відрізок графіка залежності ППР сигналу від кількості бактеріальної культури у розчині знаходиться в діапазоні концентрацій від 10 до 10^6 кл/ см^3.

Універсальною модифікацією поверхні ППР імуносенсора є використання поліаліаміну гідрохлориду (ПАА) і орієнтації антитіл за допомогою білка А (рис. 7). Встановлено, що чутливість відгуку знаходилась в межах 10^1–10^3 кл/см^3 .

Чутливість імуносенсора з використанням моношару антитіл, сформованого на невкритій поверхні золота, становила 100 кл/см^3, лінійна ділянка графіка лежить у межах 10–100 кл/см^3. Встановлено, що формування на поверхні перетворювача багатошарової (тривимірної) розгалуженої структури з антитіл за допомогою поліелектролітів та білка А *Staphylococcus aureus* дозволяє значно підвищити чутливість ППР імуносенсора за іммобілізації антибактеріальних антитіл для експрес-індикації *P. aeruginosa*.

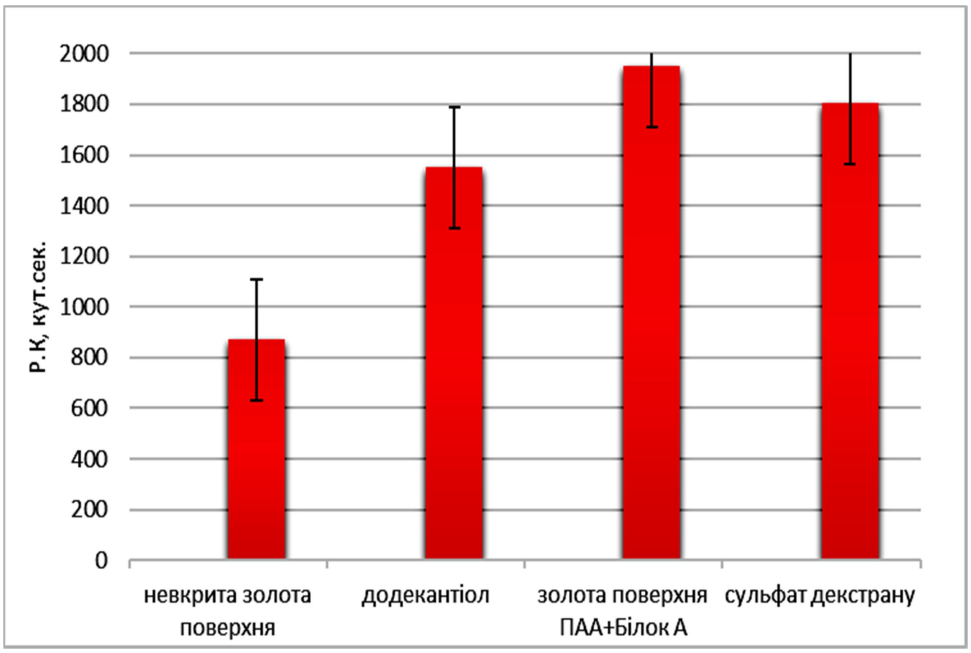

Рис.7. **Відгук ППР біосенсора на внесення розчину антигену до *P. aeruginosa* в концентрації 10 кл/см ^{3} за використання різних варіантів чутливої поверхні :**
1 –невкрите золото, 2 – додекантіол, 3 – золото, вкрите шаром ПАА+Білок А,
4 – сульфат декстрану.

Результати щодо іммобілізації визначення *S. typhimurium* ідентичні результатам за дослідження *P. aeruginosa,* які наведені вище.

Висновки. Таким чином, було проаналізовано ефективність іммобілізації селективного біологічного матеріалу на поверхні перетворювача ППР, попередньо вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами), для створення функціонально стабільних уніфікованих чутливих елементів оптичного імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу. Оскільки чутливість та специфічність ППР біосенсора є достатньо високою для проведення експресного аналізу проб з метою експрес-індикації *P. aeruginosa*, то не потрібно застосовувати високовартісні сполуки та ускладнювати алгоритм проведення аналізу. Використання поліелектролітів для модифікації поверхні перетворювача імунного біосенсора на основі ППР є найбільш доцільним, дешевим і простим.

Також слід додати, що загальна тривалість аналізу розробленим імуносенсором становить лише понад 40 хв, включаючи час, витрачений на іммобілізацію антитіл на поверхні трансдюсера, блокування вільних місць зв'язування та промивання вимірювальної комірки. Сама ж процедура тестування не перевищує 10 хв, і це робить аналіз експресним, особливо зважаючи на те, що поверхня трансдюсера обладнана змінними пластинками, які можуть бути попередньо підготовлені і використані в разі потреби.

Імунобіосенсорний аналіз можливо проводити в польових умовах, а приладова частина для його здійснення може мати портативний вигляд. Усе це створює умови для простого, швидкого та дешевого бактеріологічного моніторингу поширення патогенних бактерій.

У подальших дослідженнях планується експериментально перевірити ефективність використання розробленої імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики наявності патогенних бактерій в об'єктах навколишнього середовища.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations / R. P. Kooyman, H.H Kolkman, J van Gent et al. // Anal.Chim. Acta. – V. 213. – 1988. – P. 35–45.
2. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors / V. Koubová, E. Brynda, L Karasová at al. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2001.– Vol.74, no. 1–3, P. 100–105.
3. Liedberg B. Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing / B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom // Sensors & Actuators B. – 1983. – № 4. – P. 299–304.

4. Novgorodova O. Immunosensors for the express detection of antibiotic resistant bacterial pathogens / O. Novgorodova, M. Starodub, V. Ushkalov // Journal for Veterinary Medicine, biotechnology and Biosafety. – 2016.– Vol.2. – Issue. 3. – P. 23–29.

5. Magneto Actuated Biosensors for Foodborne Pathogens and Infection Diseases Affecting Global Health / I. M. Pividori, A. B. Aissa, D.Brandao, S.Carinelli // Biosensors for Security and Bioterrorism Applications, Part of the series Advanced Sciences and Technologies for Security Applications, 13 March 2016. –P. 83-114.

6. Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold N. F. / V. Starodub, M. Starodub, F. Bozoglu at al. // Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry:NATO Proceedings. – Cluver Acad. Publ., 2001. – P. 63–94.

7. Efficiency of Instrumental Analytical Approaches at the Control of Bacterial Infections in Water, Foods and Feed / N. Starodub, J. Ogorodniichuk, O. Novgorodova, P. Nikolelis // Biosensors for Security and Bioterrorism Applications, 2016. – 199 p.

8. Optical immune biosensor «Plasmon Test» for the determination of Salmonella typhimurium, / N.F. Starodub, I. Ogorodniichuk, T. Lebedeva, P. Shpylovyy // Sensor Electronics and Microsystems Technology. – 2013. – Vol. 10, no 1. – P. 106-113.

9. The rapid alert system for food and feed 2013, Annual report. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2014.http:// ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htmi.

10. Wang Y. Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens / Wang Y., Alocilja E. // Journal of Biological Engineering – 2015. – Vol. 9–16 p.

11. Антибіотикорезистентність клінічних штамів Pseudomonas Aeruginosa у хірургічних стаціонарахУкраїни в 2010 році / В.В. Лазоришинець, А.Г. Салманов, В.Ф. Марієвський, М.К. Хобзей. // Україна. Здоров'я нації. – 2011. – № 2. – С. 162-169.

12. Новгородова О. Ю. Розробка імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики Pseudomonas aeruginosa / О. Ю. Новгородова , М. Ф. Стародуб // Біологія тварин. – 2016. – №. 3. – Том 18. – С. 66–70.

13. Новгородова О. Ю. Експрес-визначення патогенних бактерій на основі імунобіосенсорної тест-системи / О. Ю. Новгородова, М. Ф. Стародуб, В. О. Ушкалов // Науковий вісник ветеринарної медицини. Збірник наукових праць/ Білоцерківського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 1 (127). – С. 82–87.

14. Пирогова Л. В. Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу / Л. В. Пирогова, Л. І. Нагаєва, М. Ф. Стародуб // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 3. – С. 88–92.

15. Пирогова Л.В. Імобілізація антигену ретровірусу лейкозу великої рогатої худоби на поверхні імунного біосенсора / Л.В. Пирогова, М.Ф. Стародуб // Biotechnologia Acta. – 2008. – Т.1, №2. – С. 52-58.

REFERENCES

1. Kooyman, R. P. H., Kolkman, H., van Gent, J. et al. (1988). Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations. Anal.Chim. Acta, no. 213, pp. 35–45.

2. Koubová, V, Brynda, E, Karasová, L, Škvor, J, Homola, J, Dostálek, J, Tobiška, P, Rošický, J. (2001). Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. Sensors and Actuators B: Chemical, vol.74, no. 1–3, pp. 100–105.

3. Lazoryshynets, V. V., Salmanov, A. G., Mariyevskyy, V. F., Khobzey, M.K. (2011). The antibiotic resistance of clinical strains of Pseudomonas Aeruginosa in surgical hospitals of Ukraine in 2010. Ukraine. Health of the Nation, no. 2, pp. 162-169.

4. Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. (1983). Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing. Sensors & Actuators B., no. 4, pp. 299–304.

5. Novgorodova, O. Yu., Starodub, M. F. (2016). Rozrobka imunobiosensornoyi test-sy`stemy` dlya ekspres-diagnosty`ky` Pseudomonas aeruginosa. Biologiya tvary`n, no.3. Tom 18. pp. 66–70.

6. Novgorodova, O. Yu., Starodub, M. F., Ushkalov, V. O. (2016). Ekspres-vy`znachennya patogenny`x bakterij na osnovi imunobiosensornoyi test-sy`stemy. Naukovy`j visny`k vetery`narnoyi medy`cy`ny`. Zbirny`k naukovy`x pracz`/ Bilocerkivs`kogo nacional`nogo agrarnogo universy`tetu, no. 1 (127), pp. 82–87.

7. Novgorodova, O., Starodub, M., Ushkalov, V. (2016). Immunosensors for the express detection of antibiotic resistant bacterial pathogens. Journal for Veterinary Medicine, biotechnology and Biosafety, Vol.2. Issue. 3, pp. 23–29.

8. Pividori, I. M., Aissa, A. B., Brandao, D., Carinelli, S., Alegre. (2016). Magneto Actuated Biosensors for Foodborne Pathogens and Infection Diseases Affecting Global Health. Biosensors for Security and Bioterrorism Applications, Part of the series Advanced Sciences and Technologies for Security Applications, pp 83-114

9. Pyrogova, L. V., Nagayeva, L. I., Starodub, M. F. (2002). Ekspresna diagnosty`ka lejkozu vely`koyi rogatoyi xudoby` za dopomogoyu imunnogo sensora na osnovi poverxnevogo plazmonnogo rezonansu. Ukr. bioxim. zhurnal,T. 74, no. 3, pp. 88–92.

10. Pyrogova, L. V., Starodub, M. F. (2008). Immobilization of antigen Bovine leukemia virus on the surface of immune biosensor. Biotechnologia Acta, vol. 1, no. 2, pp. 52-58, available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2008_1_2_7 (in Ukrainian)

11. Starodub, N. F., Starodub, V. M. Ultrathin (2001). Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry. [Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold]. NATO Proceedings / Ed. F. Bozoglu et al., Cluver Acad. Publ., pp. 63–94.

12. Starodub, N., Ogorodniichuk, J., Novgorodova, O. (2016). Rozrobka imunobiosensornoi' test-systemy dlja ekspres-diagnostyky Pseudomonas aeruginosa. [Efficiency of Instrumental Analytical Approaches at the Control of Bacterial Infections in Water, Foods and Feed]. Biosensors for Security and Bioterrorism Applications, Edited by Dimitrios P. Nikolelis, pp. 199-217.

13. Starodub, N.F., Ogorodniichuk, I., Lebedeva, T., Shpylovyy, P. (2013). Ekspres-vyznachennja patogennyh bakterij na osnovi imunobiosensornoi' test-systemy. [Optical immune biosensor «Plasmon Test» for the determination of Salmonella typhimurium] Sensor Electronics and Microsystems Technology, Vol. 10, no 1, pp. 106-113.

14. The rapid alert system for food and feed (2013). Annual report. Luxembourg: (2014), Ekspresna diagnostyka lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby za dopomogoju imunnogo sensora na osnovi poverhnevogo plazmonnogo rezonansu [Publications Office of the European Union]. available at: http:// ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htmi.

15. Wang, Y, Alocilja, E. (2015). Imobilizacija antygenu retrovirusu lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby na poverhni imunnogo biosensora .[Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens]. Journal of Biological Engineering no. 9, pp. 16.

Модификация поверхности иммуносенсора для иммобилизации антибактериальных антител

А. Ю. Новгородова, М. Ф. Стародуб, В. А. Ушкалов, Ю. А. Огороднийчук

Проанализирована эффективность иммобилизации антибактериальных антител на поверхности трансдюсера, покрытой различными химическими агентами (додекантиолом, полиэлектролитами и производными декстрана) для создания функционально стабильных унифицированных чувствительных элементов оптического имунносенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что использование полиэлектролитов полиалиламина гидрохлорида и полистиренсульфоната для модификации поверхности преобразователя биосенсора является наиболее целесообразным, дешевым и простым при проведении скрининговых исследований. Переменные пластинки, используемые в качестве биочипов, могут быть подготовлены заранее и использованы в случае необходимости.

Ключевые слова: бактерии, P. aeruginosa, S. typhimurium, иммуносенсор, трансдюсер, полиэлектролит, биочип, поверхностный плазмонный резонанс.

Modification of the immunecensor sureace for the antibacterial antibodies immobilisation

O. Novgorodova, M. Starodub, V. Ushkalov, J. Ogorodniichuk

Previous studies had shown the effectiveness of immune based SPR biosensor for recording specific antibody-antigen interactions, and proved the possibility of using it for Rapid Determination of P. aeruginosa and S. typhimurium. For this transducer immobilized on the surface of antibacterial antibodies. Immobilization of antibodies on the gold surface provided selectively binding to an antigen of bacterial culture.

It turned out that the analysis essentially depends on how prepared the gold layer on the glass surface of the manner in which this surface is pre-treated and the state of immobilized biological material on the surface transducer.

Drawing on different coatings of golden coat can increase the sensitivity immunosensor. Specifically, the touch surface modification by dodecanoyl increases it 1.3 times. In addition, if the immobilization of biological molecules regular physical adsorption on a clean surface gold or pretreated dodecanoyl or polyelectrolyte pretty much of it can be blocked due to contact active sites (e.g. antigen-binding sites) on the surface. To avoid this shortcoming, using various approaches, including the most common are oriented inclusion of biological molecules in the tissue Langmuir-Blodgett different composition or previous immobilization on a surface protein A from Staphylococcus aureus and lectins with affinity to the Fc fragment of IgG or its carbohydrate component. In our studies, special attention is paid to optimizing the conditions selective immobilization of biological material.

This article presents experimental data for comparative use of polyelectrolyte, thiols and dextran derivatives for the immobilization of antibacterial antibodies to ensure process efficiency and operational stability by preparing surface of transducer.

Transducer's surface modification of thiols has little effect on the sensitivity analysis and determining the intensity of its interaction with specific immune antibodies contained in serum is approximately the same as without the use of thiols.

This is due to the fact that the orientation of antibody determinants on the gold surface transducer not conducive to their maximum exposure as in the case when applied pre-polyelectrolyte layer. However, such a modification stabilizes the adsorption of antigen and enhancing the reproducibility of test results. The discrepancy results when measuring one sample is much smaller compared to the case where the antibodies are immobilized directly on the surface of gold. Thus, it is shown that the use dodecanoyl and PAA polyelectrolyte coating layer of gold on the surface of the converter allows primarily to increase the reproducibility of sensing elements of the immune optical biosensor based on outage.

It is shown that the preparation of the sensitive surface thus significantly increases the sensitivity analysis, which in this case was 10 cells /ml, and the linear segment plot of SPR signal on the number of bacterial culture in the solution is in the range of concentrations from 10 cells /ml to 106 cells /ml. Sensitivity immunosensor using antibody monolayer formed on the gold surface without modifications was 100 cells / ml, linear plot graphics in the range of 10-100 cells /ml. It was established that the formation on the surface of the transducer multilayer (three-dimensional) branched structure of antibodies using polyelectrolyte and glutaraldehyde can significantly increase the sensitivity of SPR imunosensora.

The effectiveness of selective immobilization of biological material on the surface of the transformer outage, previously covered with different chemical agents (dodecanoyl, polyelectrolyte), to create a unified functionally stable As sensitivity and specificity of the biosensor SPR is high enough for express analysis of samples for the purpose of rapid indication of bacteria then there is no need to use high-value compounds and complicate the analysis algorithm. Use polyelectrolyte for surface modification of immune converter SPR biosensor based on the most appropriate, affordable and simple.

It should also be added that the total duration of the analysis developed immunosensor is just over 40 minutes, including the time spent on the immobilization of antibodies on the surface transducer, blocking free binding sites and washing the measuring cell. The very same test procedure does not exceed 10 minutes, and it does express analysis, especially considering the fact that the surface transducer equipped with interchangeable plates, which can be pre-prepared and used as needed.

SPR analysis may be carried out in the field, as part of the instrument for its implementation can be portable form. All this creates conditions for a simple, fast and cheap approaches to control of spread of pathogenic bacteria.

Key words: bacteria, P. aeruginosa, S. typhimurium, immunosensor, transducer, polyelectrolyte, biochips, surface plasmon resonance.

Надійшла 12.09.2017 р.