

БИОСЕНСОРИ BIOSENSORS

УДК 544.6: 544.651.13 + 54.061: 615.074: 53.088.6

РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗМЕРИТЕЛЬНО-ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО КОМПЬЮТЕРИЗИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ КУЛОНОВОЛЬТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И БИОСЕНСОРНОЙ ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕНОВ

В. В. Джелали, Д. Н. Чернышенко, И. Ю. Кучма, Н. А. Короткова, Т. П. Осолодченко

*Государственное учреждение “Институт микробиологии и иммунологии
им. И.И. Мечникова НАМН Украины”,
ул. Пушкинская, 14-16, г. Харьков, 61057, Украина.
e-mail: vvdgelali@gmail.com*

РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗМЕРИТЕЛЬНО-ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО КОМПЬЮТЕРИЗИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ КУЛОНОВОЛЬТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И БИОСЕНСОРНОЙ ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕНОВ

В. В. Джелали, Д. Н. Чернышенко, И. Ю. Кучма, Н. А. Короткова, Т. П. Осолодченко

Аннотация. Создан и апробирован быстродействующий измерительно-вычислительный компьютеризированный комплекс для регистрации кулоновольтных характеристик (КВХ) межфазных границ. Проведен синтез на поверхности металлических индифферентных электродов индикаторной двухмерной фазы, наноразмерной по координате электрохимической реакции, из антител *S. aureus*. Показано, что все измеренные КВХ межфазной границы Pt|1НАНО ИМ антитело *S. aureus*| патогенные клетки *S. aureus* в PBS, расположены внутри КВХ от межфазной границы Pt|1НАНО ИМ антитело *S. aureus*| PBS. Проведен анализ кулоновольтных характеристик. Сконструирован биосенсор и разработан электрохимический метод лабораторной регистрации патогенных штаммов микроорганизмов. Предложен количественный кулоновольтметрический метод регистрации адсорбированных, сильно связанных с рабочей поверхностью биосенсора иммунных комплексов, образование которых обусловлено комплементарными взаимодействиями патогенная клетка – антитело.

В работе предложено анализировать экспериментальные данные в логарифмической системе координат $\lg c_{S. aureus, теор} = f(\lg c_{S. aureus, экс})$ в отличие от используемой повсеместно системы координат $c_{S. aureus, теор} > c_{S. aureus, экс}$.

Показано, что базовые образцы биосенсоров имеют между расчетными и заданными концентрациями патогенных микроорганизмов коэффициенты корреляции 0,99 и выше.

Ключевые слова: биосенсор, антитело, антиген, клетки *S. aureus*, кулоновольтметрия

РОЗРОБКА ТА ВИКОРИСТАННЯ ВИМІРЮВАЛЬНО-ОБЧИСЛЮВАЛЬНОГО КОМП'ЮТЕРИЗОВАНОГО КОМПЛЕКСУ ДЛЯ РЕЄСТРАЦІЇ КУЛОНОВОЛЬТНИХ ХАРАКТЕРИСТИК І БІОСЕНСОРНОЇ ІНДИКАЦІЇ ПАТОГЕНІВ

В. В. Джелалі, Д. М. Чернишенко, І. Ю. Кучма, Н. О. Короткова, Т. П. Осолодченко

Анотація. Створено та апробовано швидкодіючий вимірювально-обчислювальний комп'ютеризований комплекс для реєстрації кулоновольтних характеристик (КВХ) міжфазних меж. Проведено синтез на поверхні металевих індиферентних електродів індикаторної двомірної фази, нанорозмірної за третьою мікроскопічною координатою, з антитілом *S. aureus*. Показано, що всі виміряні КВХ від міжфазної межі Pt|1НANO ІМ антитіла *S. aureus*|х патогенні клітини *S. aureus* у PBS, де х - кількість клітин *S. aureus* ATCC 25923 в розчині PBS, розташовані всередині КВХ від міжфазної межі Pt|1НANO ІМ антитіла *S. aureus*|PBS. Проведено аналіз кулоновольтних характеристик. Сконструйовано біосенсор та розроблено електрохімічний метод лабораторної реєстрації патогенних штамів мікроорганізмів. Запропоновано кількісний метод реєстрації адсорбованих, сильно пов'язаних з робочою поверхнею біосенсора імунних комплексів, утворення яких зумовлено комплементарними взаємодіями патогенної клітини та антитіла. Показано, що базові зразки біосенсорів мають коефіцієнти кореляції 0,99 і вище між розрахунковими і заданими концентраціями патогенних мікроорганізмів.

Ключові слова: біосенсор, антитіло, антиген, клітина *S. aureus*, кулоновольтметрия

DEVELOPMENT AND USING OF MEASURING-CALCULATING COMPUTERIZING COMPLEX FOR REGISTRATION OF COLONO-VOLTAGE CHARACTERISTICS AND BIOSENSORY INDICATION OF PATHOGENS

V. V. Jelali, D. N. Chernyshenko, I. Y. Kuchma, N. A. Korotkova, T. P. Osolodchenko

Abstract. A fast measuring computerized system for registering culon-voltage characteristics (CVC) for interphase boundaries was created and approved. The indication dimensional phase (IDP) synthesized from antibodies to *S. aureus* on the metal surface of the indifferent electrode, where IDP have phase with nanoscale electrochemical reaction coordinate. It is shown that all the measured phase boundary CVC Pt | 1NANO MI antibody *S. aureus* | pathogenic *S. aureus* cells in PBS, located inside CVC from the interface Pt | 1NANO MI antibody *S. aureus* | PBS.

The analysis of cullon-voltage characteristics carried out. Biosensor was designed and the electrochemical method for laboratory registration of pathogenic microorganisms strains was developed. The quantitative cullon-voltage method detection for immune complex (IC), that strongly adsorbed and associated with the biosensor working surface was developed. The IC formation is due to the complementary interactions of pathogenic cells - antibody.

In this paper it was proposed to analyze the experimental data in logarithmic coordinates $\lg c_{S. aureus, theor} = f(\lg c_{S. aureus, exp})$ unlike widely used coordinate system $c_{S. aureus, theor} \approx c_{S. aureus, exp}$.

It is shown that the basic patterns of biosensors, between the calculated and specified concentrations of pathogens, have correlation coefficients of 0.99 and above.

Keywords: biosensor, antibody, antigen, cells *S. aureus*, Culon – voltmetry

ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения гнойно-воспалительных и послеоперационных инфекционных осложнений, вызванных *S.aureus*, является весьма актуальной. Такое положение вещей связано как с высокой распространенностью, так и с высокой резистентностью этого возбудителя, к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим препаратам. Несмотря на разработку традиционных методов диагностики возбудителя, идёт поиск новых решений данной задачи. Поэтому разработка биосенсоров и методов регистрации этих микроорганизмов в патологическом материале представляет приоритетную задачу.

Важным элементом биосенсора является распознающая фаза, содержащая биологически активные компоненты. В зависимости от поставленной задачи используют твердотельные ионообменные мембраны [1], электрохимически синтезируемые полимерные платформы [2, 3], электрохимическую самосборку полимолекулярных слоев с использованием тиольных и α, ω -тиольных компоновщиков [2, 4]. Получение твердотельных ионселективных мембран на углеродистой инертной матрице методами, описанными в литературе, приводит к неконтролируемой их толщине, и поэтому нуждается в доработке [5]. Инкорпорирование биологически активных веществ в такую матрицу представляет значительные трудности. Электросинтез полимерных платформ для применения их в биосенсорах достаточно полно разработан, однако, и в этом случае, введение антител или антигенов в матрицу мембраны, а также сохранение их длительной стабильности представляют определенные сложности. В виду низкой проводимости полимеров анилина, пиррола и их производных, в полимерную матрицу необходимо инкорпорировать наночастицы золота [6].

Для регистрации электрических информационных сигналов от биосенсорных систем наиболее часто используют не прямые методы, такие как потенциометрию, метод электропроводности или проводимости. Одним из таких методов ранней

диагностики инфекционных болезней является амперометрический биосенсорный метод распознавания в биологических жидкостях и тканях продуктов жизнедеятельности патогенных бактерий. Существенным недостатком этих методов является то, что при их использовании регистрируются не клетки патогенных микроорганизмов, а продукты их химического распада. Последнее приводит к неоднозначности в определении патогенных клеток. Решению части из этих проблем посвящена данная работа.

Как альтернативу этим методам нами предлагается применять кулоновольтметрический метод (КВМ), экспериментальные данные которого можно использовать для определения непосредственно самих патогенных микроорганизмов, комплементарных взаимодействий антиген – антитело, клетка – антитело и вида зависимостей $c_{\text{теор}} = f(c_{\text{экс}})$ и их анализа. Он лишён неоднозначностей свойственных перечисленным выше методам. Однако реализация этого наиболее естественного и прямого электрохимического метода определения патогенных микроорганизмов наталкивается на ряд трудностей. В литературе отсутствует как описание количественного метода КВМ для определения патогенных штаммов микроорганизмов, антигенов (АГ) или антител (АТ), так и описание быстродействующих биосенсоров которые можно применять для их регистрации.

Целью данной работы является разработка метода количественного распознавания патогенных микроорганизмов, их антигенов с помощью кулоновольтметрического метода и создание быстродействующих биосенсоров для регистрации комплементарных взаимодействий (иммунных реакций комплексообразования) между АТ *S. aureus* и АГ *S. aureus*.

ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы. В экспериментах использовали специфичный стафилококковый иммуноглобулин (антиальфа-стафилолизин) производства Николаевской областной станции переливания крови, штамм *S. aureus* ATCC 25923, который находится в коллекции лаборатории биохимии микроорганизмов

и питательных сред ГУ “ИМИ НАМН Украины”. Для контроля экспериментальных данных применяли антистафилококковый препарат (АСП) производства Научно-исследовательского центра Игнатова (Россия) с содержанием основных инактивированных микробных клеток (м.к.) в 1 мл: *S. aureus* штамм S6-Z15M – 1×10^9 м.к., *S. aureus* штамм FR-1-722 – 1×10^9 м.к., *S. aureus* штамм 493 – 1×10^9 м.к. В состав АСП входят вспомогательные вещества: полисахарида глюкан 0,15% и формалин 0,5%. Их влияние на экспериментальные данные, полученные в работе, не превышает 0,01 % от измеряемых величин, и поэтому находится в пределах экспериментальной ошибки измерений.

Использованные в работе химические реактивы NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , HNO_3 , H_2SO_4 , H_2O_2 были марки х.ч.

Штамм *S. aureus* ATCC 25923 сохраняли в полужидкой среде. Жизнедеятельность патогенных клеток поддерживали методом пересева на твердую питательную среду. Культуральные и морфологические свойства микроорганизмов подтверждались путём посева на селективные среды (питательный агар) и микроскопией клеток. Стандартные среды готовили в соответствии с требованиями производителя. Приготовление питательных сред осуществляли согласно ГОСТу 10.444.1–84 (СТСЭВ 3833–82) [7].

Электрохимическая ячейка. В экспериментах использовали специально сконструированную стеклянную ячейку (рис. 1) производства SLK с рабочим объёмом 4 мл, удовлетворяющую всем требованиям, предъявляемым для прецизионных измерений. Рабочий, вспомогательный отсеки, и отсек электрода сравнения отделялись друг от друга стеклянными шлифами.

Подготовка растворов электролитов. Фоновым раствором электролита служил фосфатный буферный раствор (PBS), моделирующий физиологическую жидкость организма, следующего состава: $8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ NaCl, $0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ KCl, $1,44 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $0,24 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ KH_2PO_4 , pH = 7,4 [8]. Все растворы АТ, АГ *S. aureus* и патогенных микроорганизмов *S. aureus* ATCC 25923S в PBS готовили на бидистилляте.

Подготовка электродов. В качестве подложек для биосенсоров использовали поликристаллическое золото квалификации о.с.ч. 00. Золотые прямоугольные электроды с площадью поверхности $1,804 \text{ см}^2$ готовили по следующей методике: очищали в растворе концентрированной HNO_3 в течение 40 мин. и затем промывали бидистиллятом. Перед нанесением двумерных плёнок дополнительную очистку электродов от органических примесей и физических загрязнений производили путем выдерживания их 40 мин при $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ в растворе “пираньи”. Раствор “пираньи” представлял собой смесь H_2O_2 и концентрированной H_2SO_4 в соотношении 1:3 [9].

Вспомогательным электродом служил прямоугольный золотой электрод, а в качестве электрода сравнения использовали полуэлемент Ag|AgCl| насыщенный раствор KCl со стандартным потенциалом 0,220 В относительно н.в.э.

В работе все потенциалы приведены в шкале н.в.э.



Рис. 1. – Электрохимическая ячейка, используемая в экспериментах.

Измерительная аппаратура. В данной работе нами предложен подход который даёт возможность превратить потенциостат ПИ 50.1.1 с программатором ПР – 8 в высокоэффективный автоматический вычислительно-измерительный компьютеризированный комплекс для исследования электрохимических и биоэлектрохимических границ раздела фаз и регистрации куллоновольтограмм, хроноамперограмм и реализации

практически любых электрохимических методов исследования, таких например как одноимпульсный или двухимпульсный методы [10]. Так в данной работе был реализован кулоновольтметрический метод количественной регистрации патогенных микроорганизмов.

Суть измерения заряда рабочего электрода биосенсора заключается в следующем. На электрохимическую ячейку с иммунным биосенсором в качестве рабочего электрода накладывается циклическое треугольное напряжение от потенциостата ПИ – 50.1.1 управляемого программатором ПР – 8. При помощи цифрового осциллографа RIGOL DS1022DC регистрируются заданное текущее напряжение на рабочем электроде биосенсора – U_1 , напряжение токового канала – U_2 и с высокой точностью (99.99%) текущее время эксперимента t . Затем в пакете Excel производим численное интегрирование полученных токов j по времени, используя уравнение

$$Q_s = \int_{t_1=0}^{t_2=n} j(t) dt \quad (1)$$

с целью расчета изменения положительных или отрицательных зарядов в анодном или катодном циклах поляризации электрохимического биосенсора. Таким образом поступали как при измерениях в чистом растворе PBS, так и при добавлении в него патогенных микроорганизмов, АГ или АТ, в зависимости от того, что из них надо определить в модельном буферном растворе электролита (в сыворотке или плазме крови).

Регистрацию кулоновольтных характеристик (КВХ) Q_s, E осуществляли с помощью созданного автоматического кулоновольтметрического комплекса, блок-схема которого показана на рис. 2, а принципиальная схема на рис. 3.

В зависимости от целей эксперимента синхронизацию аппаратуры проводили от любого из 8 шагов программатора ПР – 8. Интерактивное управление работой измерительного компьютеризированного комплекса осуществляли через графический программный интерфейс цифрового осциллографа RIGOL DS1022DC. Экспериментальные данные записывали в файл с расширением xls.

Для построения и описания кулоновольтных Q_s, E , вольтфарадных C_s, E и C_a, E зависимостей и анализа электродных процессов, реализующихся в мономолекулярных адсорбированных слоях, использовали теорию А. Moline и J. Gonsalez [6].

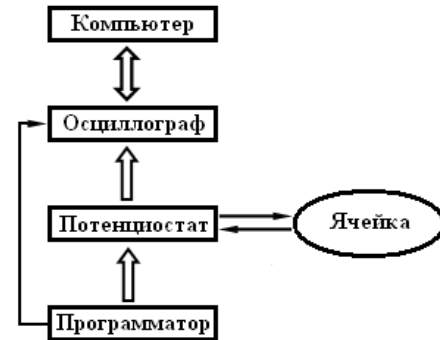


Рис. 2. Блок-схема автоматического компьютеризированного измерительно-вычислительного кулоновольтметрического комплекса.

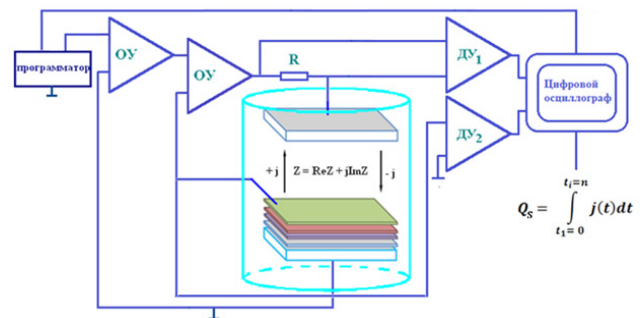


Рис. 3. Принципиальная схема кулоновольтметрического измерительно-вычислительного компьютеризированного комплекса для исследования электрохимических и биоэлектрохимических межфазных границ.

Обработка информационных сигналов.

Для увеличения точности измерений проводили калибровку линейно изменяемых значений потенциалов по временной шкале. Для этого, по предложенной нами методике, все экспериментальные $E = f(t)$ зависимости аппроксимировали линейными уравнениями. По ним рассчитывали скорректированные значения потенциалов E . Исправленные циклические вольтамперметрические (j, E) зависимости сглаживали при помощи программного пакета, использующего

процедуру скользящего среднего значения, предложенную Savitzky и Golay [11]. Затем из них рассчитывали хронокуллоно- и кулоновольтметрические зависимости (Q_s , t ; Q_s , E ; Q_a , E).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И ИХ АНАЛИЗ

Главным элементом биосенсора является наноразмерная по координате электрохимической реакции распознающая промежуточная органическая фаза, содержащая биологически активные компоненты. Нами (см. рис. 4) на поверхности золотых подложек получены однослойные и многослойные сэндвичеподобные структуры, содержащие конденсированные мономолекулярные двумерные биологически активные пленки антител *S. aureus* [12, 13]. Они наноразмерны по координате электрохимической реакции, а их электрохимические характеристики воспроизводимы и устойчивы во времени. Аналогичные структуры мы использовали в качестве биосенсора.

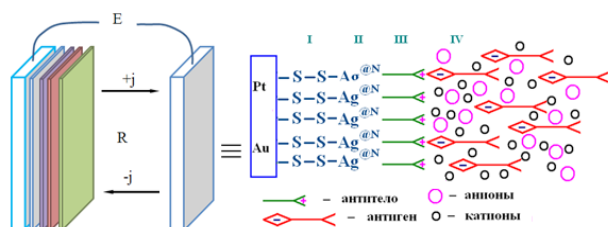


Рис. 4. – Иммунный электрохимический биосенсор и его структурная схема с четырьмя двумерными слоями, наноразмерными по координате электрохимической реакции, для распознавания и идентификации антигенов патогенных микроорганизмов.

В работе исследовали границы раздела фаз:

$$\text{Pt} | \text{1НАНО ИМ АТ } S. aureus | \text{PBS}; \quad (2)$$

$$\text{Pt} | \text{1НАНО ИМ АТ } S. aureus | \text{патогенные клетки } S. aureus \text{ в PBS} \quad (3)$$

где: 1НАНО ИМ АТ *S. aureus* – иммобилизованный наноразмерный мономолекулярный слой антител *S. aureus*, *S.*

aureus – клетки или антигены *S. aureus* ATCC 25923 в растворе PBS.

На рис. 5 показаны КВХ измеренные в системах (2) и (3). Увеличение в системе (3) концентрации клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923 приводит к образованию на рабочей поверхности биосенсора адсорбированных поверхностных иммунных комплексов. Иммунные комплексы образуются в результате комплементарных взаимодействий антиген–антитело. Они блокируют рабочую поверхность биосенсора, изменяя электрические и диэлектрические параметры этой границы раздела фаз. Вследствие адсорбции и сильного связывания патогенных клеток антителами, закреплёнными на поверхности подложки биосенсора, происходит блокировка поверхности биосенсора, уменьшается заряд как внутренней, твёрдой, так и внешней, жидкой обкладки двойного электрического слоя. При увеличении концентрации патогенных клеток в растворе PBS количество заряда при заданном потенциале, прошедшее через межфазную границу (3), уменьшается. В тоже время степень заполнения θ поверхности биосенсора иммунными адсорбированными комплексами АТ – *S. aureus* ATCC 25923 стремится к 1.

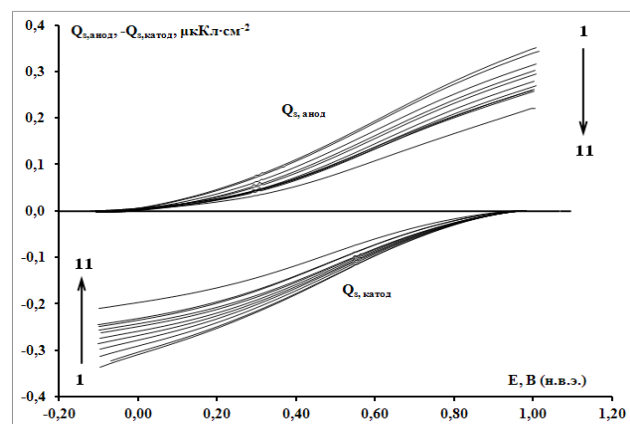


Рис. 5. КВХ, измеренные в системе: Au|1НАНО ИМ АТ *S. aureus*| клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* ATCC 25923 в PBS. Рабочий электрод – Au 00. $S = 1,80 \text{ см}^2$. $C, \text{ кл} \cdot 10^{-9}$: 1 – 0 (без перемешивания раствора); 2 – 0; 3 – 0,0182; 4 – 0,0415; 5 – 0,0707; 6 – 0,1288; 7 – 0,2256 0; 8 – 0,303; 9 – 0,3664; 10 – 0,4192; 11 – 0,1 мл раствора АСП (контроль).

При фиксированном потенциале между анодными – $Q_{s, \text{анод}}$ и катодными – $-Q_{s, \text{катод}}$

зарядами и логарифмами концентраций патогенных клеток *S. aureus* (рис. 6, рис. 9) нами выявлены линейные зависимости. Они подобны Нернстовской зависимости потенциала от логарифма концентраций антигенов (или Red/Ox форм).

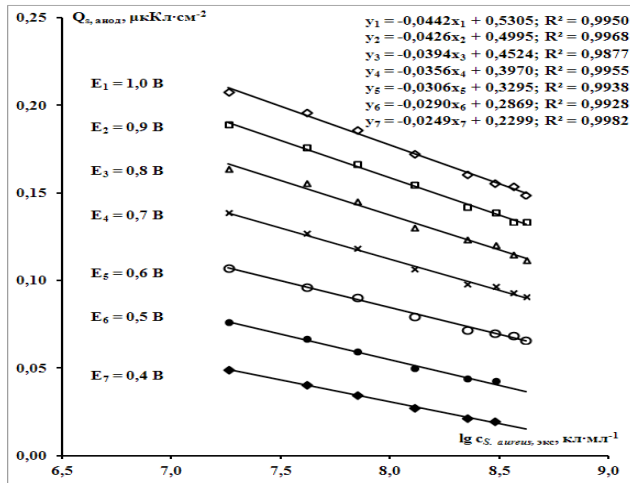


Рис. 6. $Q_{s, \text{анод}}, \lg c_{s.aureus, \text{экс}}$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt|ИМ АТ *S. aureus*|клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS.

Зависимость измеренного суммарного заряда Q_s двойнослойного конденсатора от концентрации патогенных клеток *S. aureus* позволяет произвести калибровку биосенсора.

Между концентрацией патогенных клеток *S. aureus* и зарядом внешней обкладки двойнослойного конденсатора биосенсора в координатах $-\lg Q_{s, \text{анод}}, \lg c_{s.aureus, \text{экс}}$ также наблюдаются линейные зависимости (см. рис. 7). Но отклонения от линейности в этом случае выше, что особенно хорошо видно на рис. 7 для кривой при $E_7 = 0,4 \text{ В}$.

Так как коэффициенты корреляции для зависимости $Q_{s, \text{анод}}, \lg c_{s.aureus, \text{экс}}$ выше, и, следовательно, между концентрацией патогенных клеток *S. aureus* и зарядом внешней обкладки двойнослойного конденсатора биосенсора, предпочтительней функциональная связь:

$$Q_{E, s, \text{анод}} = f(\lg c_{s.aureus, \text{экс}}). \quad (4)$$

Энергия комплементарного взаимодействия антиген-антитело $U_{\text{комп}}$ меньше энергии электростатического взаимодействия зарядов $U_{\text{эл}}$, и в случае взаимодействия антиген-

антитело велика. Это позволяет ввести соотношение:

$$U_{\text{комп}} = kU_{\text{эл}} \quad (5)$$

где k – безразмерный стерический коэффициент.

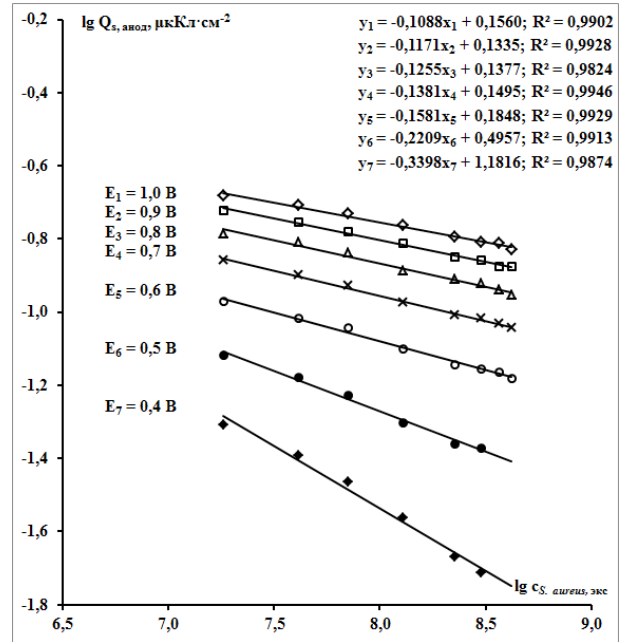


Рис. 7. $\lg Q_{s, \text{анод}}, \lg c_{s.aureus, \text{экс}}$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt|ИМ АТ *S. aureus*|клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS.

Стерический коэффициент k меньше 1. Чем сильнее комплементарное взаимодействие антиген-антитело или антитело – патогенная клетка, тем ближе коэффициент к 1.

На рис. 8. представлена зависимость логарифма теоретической концентрации клеток *S. aureus* ATCC 25923 от логарифма заданной концентрации клеток патогенного штамма *S. aureus* при различных значениях потенциала E поверхности биосенсора. Из анализа этого рисунка следует, что коэффициенты корреляции между $\lg c_{s.aureus, \text{теор}}, \lg c_{s.aureus, \text{экс}}$ для всех рассчитанных линейных зависимостей больше 0.99, что указывает на высокую избирательность созданного биосенсора. Для медицинских целей достаточно, чтобы коэффициент корреляции превышал значение 0.95.

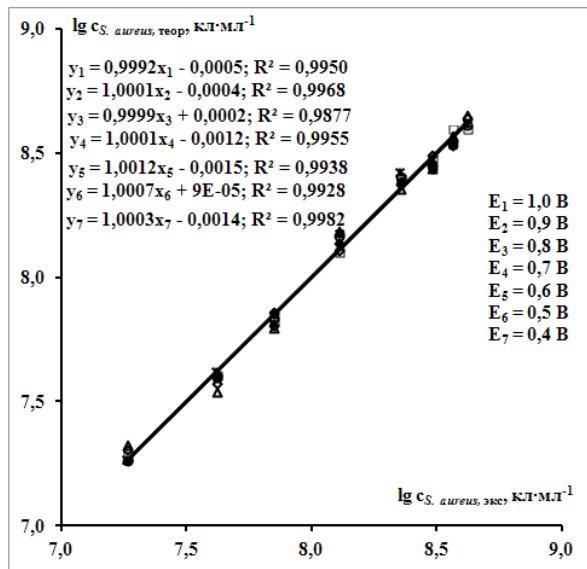


Рис. 8. $\lg c_{S. aureus, теор}, \lg c_{S. aureus, экс}$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt| ИМ АТ *S. aureus*| клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS.

Линейные концентрационные зависимости $-Q_{s, катод}, \lg c_{S. aureus, экс}$ наблюдаются и при катодных потенциалах поверхности биосенсора в случае катодного цикла вольтамперограммы (см. рис. 9). Обращает на себя внимание тот факт, что коэффициенты корреляции r^2 больше для срезов $-Q, E$ зависимостей при более отрицательных потенциалах поверхности биосенсора. На рис. 10 представлены зависимости логарифма теоретической концентрации клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923 от логарифма заданной концентрации клеток патогенного штамма *S. aureus* при отрицательных зарядах поверхности биосенсора. Для них характерны все перечисленные выше свойства, полученные для положительных зарядов поверхности.

Сравнение рис. 8 и рис. 10 показывает, что для зависимостей $\lg c_{S. aureus, теор}, \lg c_{S. aureus, экс}$ в обоих случаях аппроксимирующие уравнения, приведенные на них, по существу, представляют собой одно и то же уравнение связи между теоретическими и экспериментальными логарифмами концентраций патогенных клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923. Поэтому на рис. 8 и рис. 10 эти линии практически не различаются между собой.

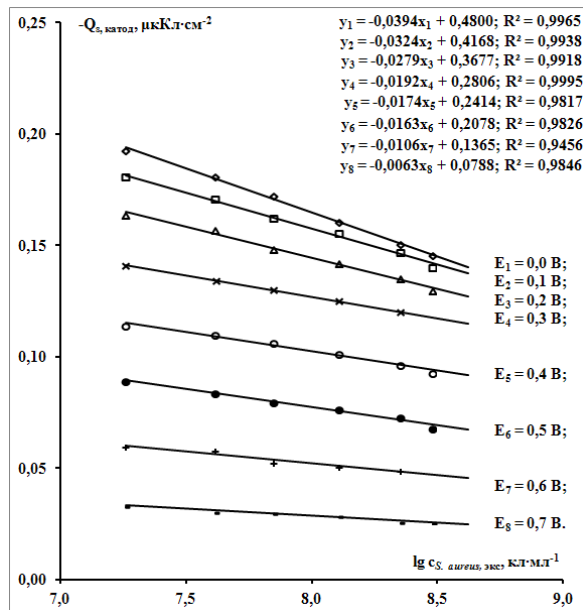


Рис. 9. $-Q_{s, катод}, \lg c_{S. aureus, экс}$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt| ИМ АТ *S. aureus*| клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS.

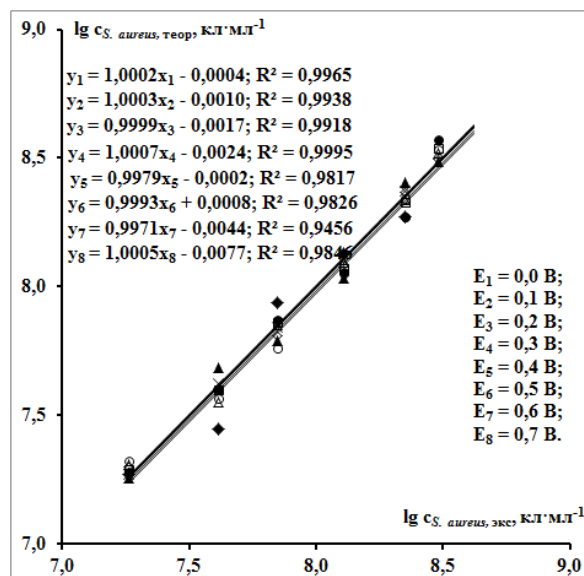


Рис. 10. $\lg c_{S. aureus, теор}, \lg c_{S. aureus, экс}$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt| ИМ АТ *S. aureus*| клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS.

Сравнение корреляционных коэффициентов зависимостей $Q_s, \lg c_{S. aureus, экс}$ для анодного и катодного циклов поляризации (рис. 6 и рис. 9) показывает, что коэффициенты корреляции для анодных циклов поляризации выше катодных. Это указывает на то, что

влияние на заряд поверхности биосенсора побочных стадий электродных процессов в катодных циклах выше, и поэтому для анализа экспериментальных данных предпочтительней пользоваться данными, полученными в анодных циклах.

Концентрационные $\lg c_{S. aureus, теор}$, $\lg c_{S. aureus, экс}$ зависимости могут быть также получены из срезов Q_s , E зависимостей (рис. 5) при постоянных положительных или отрицательных зарядах поверхности биосенсора:

$$E_{Q, s, анод} = f(\lg c_{S. aureus, экс}) \quad (6)$$

$$E_{Q, s, катод} = f(\lg c_{S. aureus, экс}) \quad (7)$$

Для исследованной системы такие Нернстовские зависимости при постоянных положительных зарядах поверхности биосенсора представлены на рис. 11, а соответствующие им концентрационные $\lg c_{S. aureus, теор}$, $\lg c_{S. aureus, экс}$ зависимости на рис. 12. Для них почти все коэффициенты корреляции превышают значение 0.99. Аналогичные $E_{Q, s, катод} = f(\lg c_{S. aureus, экс})$ и $\lg c_{S. aureus, теор} = f(\lg c_{S. aureus, экс})$ зависимости рассчитаны и для отрицательных зарядов поверхности биосенсора.

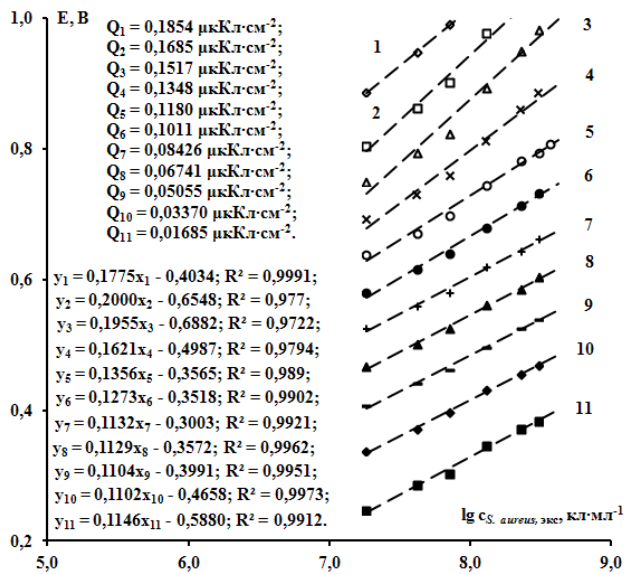


Рис. 11. $E_{Q, s, анод} = f(\lg c_{S. aureus, экс})$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt| ИМ AT *S. aureus*| клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS.

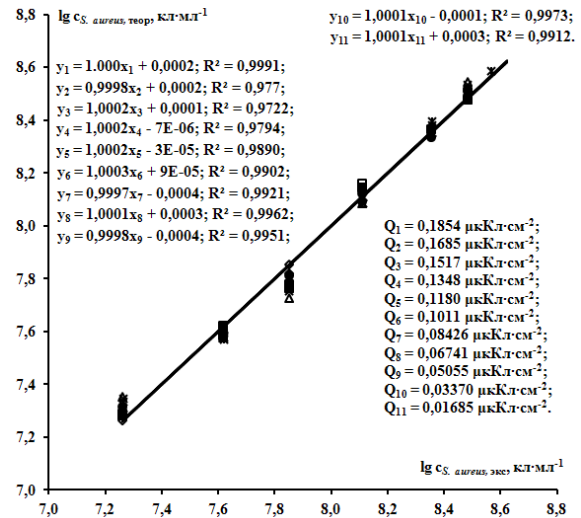


Рис. 12. $\lg c_{S. aureus, теор} = f(\lg c_{S. aureus, экс})$ зависимости, рассчитанные для системы: Pt| ИМ AT *S. aureus*| клетки патогенных микроорганизмов *S. aureus* в PBS при положительных зарядах рабочей поверхности биосенсора.

Установленная линейная зависимость между анодными или катодными зарядами поверхности биосенсора и логарифмами концентрации патогенных клеток является фундаментальным свойством иммунных электрохимических биосенсоров. Именно эта связь позволяет использовать метод КВМ для количественного определения патогенных клеток. Анализ экспериментальных данных КВМ в логарифмических концентрационных координатах позволяет выяснить основную тенденцию в различии между экспериментальными и теоретически рассчитанными концентрациями микроорганизмов и, тем самым, подтвердить точность расчетов теоретических концентраций.

Метод КВМ и разработанные в работе высокоскоростные, высокоточные электрохимические иммунные биосенсоры с наноразмерной мономолекулярной фазой распознающего элемента позволяют использовать их для анализа биологически активного материала в медицине и фармакологии, в лабораториях биобезопасности, пищевой промышленности, экологии, сельском хозяйстве. Высокая избирательность полученных биосенсоров позволяет применять их при проведении аналитического контроля в производстве иммунных препаратов.

ВЫВОДЫ

В работе описан и использован прямой куллоновольтметрический метод количественного определения клеток патогенных микроорганизмов. Предложен количественный метод регистрации адсорбированных, сильно связанных с рабочей поверхностью биосенсора иммунных комплексов, образование которых обусловлено комплементарными взаимодействиями патогенная клетка – антитело. Создан и испытан высокоскоростной базовый электрохимический иммунный биосенсор с наноразмерной мономолекулярной фазой распознающего элемента для количественной идентификации патогенных клеток в реальных условиях. Показано, что все базовые образцы биосенсора имеют между заданными и расчетными концентрациями патогенных микроорганизмов коэффициенты корреляции в диапазоне 0,980 – 0,997. В работе предложена и апробирована концентрационная логарифмическая система координат в отличие от используемой повсеместно системы координат $c_{S. aureus, теор}$, $c_{S. aureus, экс}$. На данном этапе экспериментальных работ нами получен большой объем экспериментального материала по количественному определению патогенных клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923 в реальных растворах сыворотки, плазмы и эритроцитарной массе крови человека. Эти массивы экспериментальных данных сейчас подвергаются математической обработке и в скором времени, будут направлены в печать.

Список использованной литературы

1. Чмиленко Ф.О., Худякова С.М. Осмії-селективні електроди на основі метилтіопірондимеркаптидів. //Науковий вісник Черновецького університету. Хімія. – 2008. – В. 401. – С. 199 – 201.
2. Ковальчук Є.П., Яцишин М. М., Ковалишин Я.С. /Речовина в інтерфазі. Фізична хімія тонких плівок. ЛНУ. Львів. – 2005. – 225 с.
3. Курись Я., Нетяга Н., Походенко В. Матрична електрополімеризація – метод одержання поліаніліну та поліпіролу, які чутливі до амінокислот. // Вісник ЛДУ. Львов. 2002. – № 42. – С. 32 – 35.
4. Хансен А.Г., Вакербарт Х., Нильсен Дж.У., Жан Ж., Кузнецов А.М., Ульstrup Е. Межфазный электронный перенос в наномасштабе и с участием отдельной молекулы // Электрохимия. – 2003. – Т. 39. – В. 1. – С. 117 – 128.
5. Аксіменьева О. І. Електрохімічні методи синтезу і провідність спряжених полімерів. – Львів: Світ. – 1998. – 154 с.
6. Moline A., Gonsalez J. Charge–potential and capacitance–potential curves corresponding to reversible redox Langmuir submonolayers of quinizarine in aqueous acidic solutions//J. Electroanal. Chem. – 2004. – Т. 49. P. 1349 – 1360.
7. ГОСТ 10.444.1–84 (СТСЭВ 3833–82).
8. Guang-Quan Mo, Jian-Shan Ye, Wei-De Zhang. Unusual electrochemical response of ZnO nanowires-decorated multiwalled carbon nanotubes. // Electrochimica Acta. – 2009. – V. 55. – P. 511–515.
9. Ge Y., Huang C., Sen D., Yu H.Z. Electrochemical investigation of DNA-modified surfaces: From quantitation methods to experimental conditions // J. Electroanal. Chem. – 2007. – V. 602. – P. 156 – 162.
10. Методы измерения в электрохимии, т.1 и 2 / Под ред. Э. Егера и А.Залкинда. М.: Мир. – 1977.
11. Savitzky A., Golay M.J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures // Anal. Chem. – 1964. – V. – 64. – P. 1627-1639.
12. Jelali V.V. Current state and prospects of development of electrochemical biosensor systems. // VI UKRAINIAN CONGRESS ON ELECTROCHEMISTRY. The congress is dedicated to the 100-th anniversary from birthday of famous Ukrainian electrochemists M.A. Loshkarev and V.V. Stender. The International Year of Chemistry 2011.
13. Джелали В.В. Количественная экспресс-идентификация антигенов и антител. //SEMST – 2013. – Т. 4 (10), № 1. – С. 85 – 96.

Стаття надійшла до редакції 10.01.2014