

БИОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 53. 082:612. 017. 1

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ

Применение для мониторинга окружающей среды

Н. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины,
ул. Леонтовича 9, 01030 Киев-30, Украина, *nstarodub@hotmail.com*

Аннотация

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ
Применение для мониторинга окружающей среды

Н. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб

Обсуждаются в суммированном виде экспериментальные результаты об использовании разработанных вариантов оптических иммунных биосенсоров его основе фотолюминесценции пористого кремния для экспрессного определения ряда биологических соединений, представляющих значение при оценке состояния окружающей среды.

Ключевые слова: пористый кремний, иммунные биосенсоры, мониторинг окружающей среды.

Анотація

БИОСЕНСОРИ НА ОСНОВІ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ПОРУВАТОГО КРЕМНІЮ
Застосування для моніторингу довкілля

М. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб

Розглядаються в підсумованому вигляді експериментальні результати, щодо застосування розроблених варіантів оптичних імунних біосенсорів на основі фотолюмінесценції поруватого кремнію для експресного визначення біологічних сполук, що мають значення при оцінці стану довкілля.

Ключові слова: поруватий кремній, імунні біосенсори, моніторинг довкілля.

Summary**BIOSENSORS BASED ON THE PHOTOLUMINESCENCE OF POROUS SILICON****Application for environmental monitoring***N. F. Starodub, V. M. Starodub*

It is summarized and discussed the experimental results about the application of the developed optical immune biosensors based on the photoluminescence of porous silicon for the express determination of number of biological substances having significance for environmental monitoring.

Keywords: porous silicon, immune biosensors, environmental monitoring.

1. Введение

В предыдущей работе [1] мы остановились на детализации некоторых подходов получения пористого кремния (ПК), его структурных особенностях и оптических свойствах, а особенно, фотолюминесценции (ФЛ). Кроме того, рассматривались экспериментальные данные о разработке оптических иммунных биосенсоров на основе ФЛ ПК и, в частности, анализировались особенности функционирования такого типа биосенсора, предназначенного для экспрессного определения миоглобина (Mb) в сыворотке крови с целью ранней диагностики развития инфарктных состояний [1, 2]. В данной работе основное внимание будет сосредоточено на анализе возможности использования ФЛ ПК для разработки оптических иммунных биосенсоров, которые могут быть использованы для мониторинга состояния окружающей среды и, в первую очередь, для определения уровня специфических биологических веществ (СБВ) в воздухе, а также для количественного выявления ряда низкомолекулярных токсических агентов.

2. Разработка биосенсора для мониторинга загрязнения воздуха лизин-продуцирующими клетками и их компонентами [3-8]

Прежде всего, необходимо обратить внимание на терминологию, используемую в данном разделе. Термин “общий белок” (ЗБ) касается как всех белковых компонентов, животного и растительного происхождения, которые поступают из воздуха естественным путем, так и тех протеинов, источником распространения которых есть биотехнологичный завод. Под сокращенным термином СБВ, или

полным его вариантом — специфические биологические загрязнители, понимаем белковые компоненты, полисахариды, клетки, используемые в процессе биотехнологического синтеза, части их мембран, и прочие антигены (АГ), которые присущи лишь данному заводу. Таким образом, СБВ представляют собой часть общего белка, или же ЗБ.

2.1. Определение чувствительности иммунного биосенсора к СБВ воздуха

На поверхности ПК иммобилизовали поликлональные антитела (АТ) кролика из раствора, концентрацией 100 мг/л в течение 60 мин. Такие значения концентрации и времени для проведения иммобилизации взяты исходя из данных, полученных при создании биосенсора для определения Mb [1]. Затем ПК с АТ на поверхности погружали в растворы СБВ, приготовленные в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мг/л путем растворения пыли из выводящей трубы завода в забуференный физиологический раствор (ЗФР). ФЛ измеряли через 60 мин. Это время было значительно большим, чем при определении чувствительности биосенсора к Mb. Оно было выбрано с учетом прогнозируемого нижнего уровня аффинности поликлональных АТ к СБВ в сравнении с аффинностью моноклональных АТ мыши к Mb человеку. Установлено, что чувствительность разработанного биосенсора к СБВ составляет 100 мкг/л. В перерасчете на единицу объема воздуха такое значение чувствительности равняется 0,33 мкг/м³. Хотя общее время проведения опыта составляло около 120 минут, его, как и в случае определения Mb [1], можно сократить за счет осуществления предварительной подготовки ПК, проводя измерения в кинетическом режиме и уменьшения вре-

мени, отведенного на образование иммунного комплекса.

2.2. Определение уровня СБВ во внутреннем воздухе биотехнологического завода

Реально СБВ поступают в воздух с биотехнологического завода по производству лизина, широко используемого в качестве кормовой примеси для скота. Такое производство расположено в г. Обухове Киевской области. Прежде всего, определяли загрязненность внутреннего воздуха 4 выбранных цехов как ЗБ, так и СБВ. Для сравнения результатов измерений регистрацию последних осуществляли с использованием двух оптических биосенсоров (на основе ФЛ ПК и биосенсорного устройства, которое базируется на оптических волокнах и усиленной хемилюминесценции), а также стандартного метода ELISA.

Биосенсор на основе оптических волокон был разработан нами [9, 10] для определения эстрадиола-17, а-2-интерферона, хорионного гонадотропина, АТ против вируса гриппа, общих IgG и клеток микроорганизмов *Salmonella typhimurium*. Он имеет чувствительность на уровне 5-10 мкг/л при условиях обычного определения уровня СБВ в воздухе и 15-20 мкг/л в модельных условиях при пульверизации АГ в камере и последующего измерения его концентрации в растворе. Указанные незначительные отличия могут быть объяснены частичной потерей антигенных частиц при пульверизации. Отклик оптического иммунного биосенсора развивается на протяжении 10 минут, а общее время анализа составляет 45 минут. Методом ELISA удается регистрировать СБВ воздуха с чувствительностью около 10 мкг/л, линейный участок зависимости экстинкции от концентрации СБВ в растворе находится в пределах 0,005 — 10 мг/л.

Результаты измерений концентрации СБВ во внутреннем воздухе завода приведены в табл. 1. По мере производства готового продукта загрязненность воздуха в соответствующих технологическому процессу помещениях возрастает более, чем в 10 раз. Это, возможно, связано с разными условиями изготовления и содержания продукции на отдельных стадиях. Процесс ферментации осуществляется в специальных ферментативных реакторах, которые подпадают под четкий контроль относительно снабжения и выхода воздуха, поддер-

жание определенного уровня температуры и обеспечения других оптимальных условий. На следующей стадии производства (выпаривание концентрата лизина) не наблюдается значительного повышения уровня загрязнения воздуха, как относительно ЗБ, так и СБВ. Это, наверное, тоже можно объяснить тем, что при осуществлении выпаривания все процессы протекают в реакторе выпаривания, характеристики которого точно контролируются. При переходе же от выпаривания к высушиванию уровень содержания как ЗБ, так и СБВ в воздухе помещений значительно повышается. Возможно, это связано с широким использованием высевок на этой стадии, а также с повышенной летучестью сухого продукта по сравнению с влажным. Понятно, что наличие этих двух факторов приводит к увеличению вероятности попадания СБВ в воздух. Как видно из данных табл. 1 наибольший вклад в загрязнение воздуха имеет процесс упаковки готовой продукции. Этот процесс есть наименее отделенным от окружающей среды по сравнению с предшествующими стадиями биотехнологического производства, что приводит к неограниченному распространению готовой продукции, а также сопровождающих ее биологических компонентов производства, способных к летучести.

Сравнение результатов о концентрации ЗБ и СБВ во внутреннем воздухе свидетельствует, что для любого из исследованных помещений завода количественное содержимое ЗБ в единице объема воздуха приблизительно в 4 раза превышает концентрацию СБВ. Это, вероятно, связано с присутствием довольно большого количества растительных белков, источником которых есть используемые растительные препараты при высушивании выработанного продукта. Такая большая разность в значениях концентраций ЗБ и СБВ указывает на невозможность использования традиционных биохимических подходов определения общего количества белка для контроля воздуха на наличие специфических биологических компонентов, которые поступают с определенного биотехнологического, пищевого или медицинского производства.

Для успешного осуществления количественной оценки СБВ, выбрасываемых данным предприятием, необходимо использовать такие методы, которые позволяли бы избе-

жать регистрации тех белков, которые не являются специфическими для данного производства. Согласно указаниям МОЗ Украины и

России определение уровня СБВ в воздухе базируется в основном на использовании традиционных биохимических методов [11-13].

Таблица 1
Концентрация ЗБ и СБВ в рабочих помещениях битехнологического завода.

№	Место забора воздуха (цех)	Концентрация ЗБ (мг/м ³)	Концентрация СБВ (мг/м ³), определенных при помощи:		
			сенсора на основе ФЛ ПК	сенсора на основе оптических волокон	метод ELISA
1.	Ферментации	0,15 ± 0,02	0,032 ± 0,008	0,035 ± 0,005	0,033 ± 0,004
2.	Выпаривания концентрата лизина	0,25 ± 0,04	0,049 ± 0,010	0,052 ± 0,007	0,053 ± 0,010
3.	Высушивания	1,60 ± 0,17	0,540 ± 0,080	0,520 ± 0,030	0,510 ± 0,030
4.	Упаковки готовой продукции.	3,50 ± 0,35	0,840 ± 0,090	0,830 ± 0,060	0,820 ± 0,010

Сравнив данные о концентрации СБВ, полученные разными методами, можно прийти к выводу, что они незначительно различаются своей точностью и в ряду точности располагаются следующим образом: ELISA-метод; биосенсор на основе оптических волокон и биосенсор на основе ФЛ ПК. Меньшую точность последнего можно объяснить тем, что в процессе проведения исследований использовали образцы ПК, полученные из разных пластин. Использование образцов ПК из разных пластин проводили с целью определения статистической значимости отличия данных для разных пластин. Оказалось, что эта разность не была статистически значимой. Более того, хотя биосенсор на основе ФЛ ПК оказался менее точным, он все же так показал результаты, отличия которых от данных ELISA и биосенсора на основе оптических волокон, также не была статистически значимой. Следует подчеркнуть, что хотя ELISA-метод и биосенсор на основе оптических волокон являются несколько более точными, они, по сравнению с биосенсором на основе ФЛ ПК, характеризуются значительно большей продолжительностью, сложностью и дороговизной анализа.

2.3. Определение СБВ в воздухе, окружающем завод

Наличие ветра, сила и его направление существенно влияют на распространение и накопление СБВ в воздухе. Поэтому забор воздуха осуществляли в 6-и отдельных местах как при наличии ветра, так и при его отсутствии. Выше было показано, что результаты мониторинга внутреннего воздуха завода, получен-

ные при использовании биосенсора на основе ФЛ ПК, подтверждены данными как метода ELISA, так и биосенсора на основе оптических волокон с использованием усиленной хемилюминесценции, а точность последнего была почти на уровне точности ELISA. Ввиду этого при определении СБВ во внешнем воздухе ограничились сравнением результатов, полученных лишь с использованием биосенсорных устройств. Независимо от наличия или отсутствия ветра содержание СБВ в воздухе уменьшается по мере отдаления от выводящей вентиляционной трубы (табл. 2). Причем, при тихой погоде в воздухе отмечается значительно более высокая концентрация СБВ, чем при ветреной погоде, что подтверждает важность проведения исследований при разных климатических условиях. При наблюдении за характером распространения СБВ в ветреный день можно прийти к выводу, что их концентрация по мере отдаления от выше указанной выводящей трубы изменяются незначительно. Эти данные вероятно можно объяснить тем, что наличие ветра оказывает содействие более широкому и более равномерному распространению компонентов, которые поступают из вентиляционного оборудования завода. Подтверждением этого могут служить результаты, полученные при отсутствии ветра, в соответствии с которыми при увеличении радиуса исследуемой территории, количественное содержание СБВ в единице воздуха значительно уменьшается.

С помощью биосенсора на основе ФЛ ПК оказалось невозможным определить загрязненность воздуха в жилой зоне, на расстоянии

4 км от выводящей трубы и при наличии умеренного ветра. Количественное содержание СБВ в данном месте лежит за пределами чувствительности этого биосенсорного устройства. Однако использование биосенсора на основе оптических волокон и усиленной хемилюминесценции давало возможность количественно оценить загрязненность воздуха СБВ и в этом районе. Это связано с более высокой чувствительностью оптического биосенсора, значение которой составляет 20 мкг в 1 л раствора, или 66 нг в 1 м³ воздуха. Хотя чувстви-

тельность биосенсора на основе ФЛ ПК ниже чувствительности оптического иммунного биосенсора, в данный момент это нельзя отнести к недостаткам первого, поскольку на сегодня пока что не существует сведений относительно минимально допустимых доз (МДД) СБВ в единице воздуха. Лишь в том случае, если значение МДД будет ниже 0,33 мкг/м³, можно будет говорить о недостаточной чувствительности разработанного биосенсора. В то же время, кажется мало возможным, что МДД не будет превышать 0,33 мкг/м³.

Таблица 2

Концентрация СБВ в воздухе разных районов г. Обухова.

№	Расстояние забора воздуха от выводной трубы	Концентрация СБВ (мкг/м ³)			
		1-ый день, умеренный ветер		2-ый день, отсутствие ветра	
		ФЛ ПК биосенсор	оптоволоконный биосенсор	ФЛ ПК биосенсор	оптоволоконный биосенсор
1.	Рядом;	0,50±0,07	0,52±0,04	3,33±0,37	3,37±0,31
2.	500 м;	0,50±0,08	0,48±0,06	2,17±0,18	2,19±0,16
3.	2 км;	0,33±0,05	0,36±0,03	1,50±0,12	1,47±0,09
4.	4 км;	0,33±0,06	0,35±0,03	1,33±0,16	1,34±0,13
5.	6 км;	<0,33	0,29±0,03	0,83±0,09	0,81±0,06
6.	2 км (направление, от центра города).	0,33±0,07	0,35±0,04	1,22±0,11	1,24±0,09

3. Разработка иммунного биосенсора для контроля уровня некоторых низкомолекулярных токсических агентов [14-19]

Выше мы рассматривали иммунные биосенсоры на основе ФЛ ПК для определения высокомолекулярных антигенов. Возникает вопрос, возможно ли их использование для контроля уровня низкомолекулярных антигенов, или как их еще называют, гаптенов. Чтобы ответить на этот вопрос мы избрали в качестве модельных объектов 2,4-дихлорфеноксисульфоновую кислоту (2,4-Д) и нонилфенол (НФ), которые являются широко распространенными гербицидами, а последний из них используется и как поверхностно-активное вещество.

Для экспериментов использовали чистые препараты НФ, его конъюгаты с соевым ингибитором трипсина (СИТ), бычьим сывороточным альбумином (БСА) и овалбумином (Ова), а также антисыворотки к этим конъюгатам. НФ, его конъюгаты и антисыворотки были любезно предоставлены нам проф. Пи-

вен Н. В. (Институт биоорганической химии АН Белоруссии, г. Минск) и проф. Дзантиевым Б. Б. (Институт биохимии РАН, г. Москва). 2,4-Д использовали производства Уральского химического завода (Россия). Его конъюгировали с БСА, Ова и пероксидазой хрена (RZ=3,0) фирмы "Sigma" (США).

Конъюгирование БСА по карбоксильной группе (КГ-конъюгат) с 2,4-Д осуществляли с помощью карбодимида. Для конъюгирования БСА по бензольному ядру (БЯ-конъюгат) использовали реактив Фентона [20] (рис. 1). IgG выделяли с помощью 33% сульфата аммония и последующей хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [21].

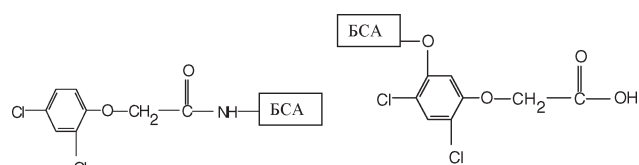


Рис. 1. Типы конъюгатов 2,4-Д с белками носителями: КГ — (справа) и БЯ — конъюгата (слева).

Большинство пестицидов, в том числе и 2,4-Д, являются гаптенами. Они становятся иммуногенными (способными вызывать в организме животных образование антител) лишь после конъюгирования с белком-носителем. Оказалось, что конъюгат с присоединением 2,4-Д к БСА через бензольное кольцо имеет большую иммуногенность по сравнению с конъюгатом, в котором задействована связь через карбоксильную группу. Преимущество конъюгата 2,4-Д с БСА по бензольному ядру в качестве иммуногена может состоять в ориентации молекулы 2,4-Д относительно носителя, а также в том, что при индукции синтеза антител выступает вся молекула 2,4-Д, включая карбоксильную группу. Полученные данные подтверждают существующие сведения [22] о важной роли выбора метода конъюгирования гаптена с белком-носителем в реализации его иммуногенных свойств. Использование IgG фракции специфических антител позволяет увеличить чувствительность ELISA-метода. Такой анализ выполняли двумя способами. В первом из них для оценки интенсивности связывания антител с гаптенем использовали антивидовые антитела, меченные ПХ. Во втором — специфические антитела иммобилизовали на твердой фазе, а определяемый гаптен и его конъюгат с ферментом-меткой находились в растворе. Другими словами анализ моновалентных антигенов, к которым относится и пестицид 2,4-Д, основывается на конкуренции между свободным гаптенем и гаптен-белковым конъюгатом за связывание с антителами.

В качестве иммобилизованного антигена при выполнении анализа первым способом использовали конъюгат 2,4-Д с Ова. Уровень связывания антител с твердой фазой в ячейках, в которые не вносили 2,4-Д, считали таким, что отвечает максимальному (100%). При использовании антител, полученных при иммунизации животных КГ-конъюгатом, чувствительность анализа была ниже, чем в случае применения антител, после иммунизации животных БЯ-антигеном. Возможно, причина здесь в том, что детерминантой, на которую вырабатываются антитела в случае БЯ-конъюгата, выступает вся молекула 2,4-Д, включая карбоксильную группу. Иными словами, детерминанта в этом случае более адекватна исходной молекуле 2,4-Д. Поэтому антитела, по-

лученные при иммунизации конъюгатом, изготовленным по БЯ-типу могут более специфично взаимодействовать со свободным 2,4-Д.

При проведении конкурентного анализа ELISA-методом с использованием конъюгата 2,4-Д с ПХ наиболее эффективными оказались конъюгаты, приготовлены в соотношении 2,4-Д и ПХ равном 4:1. Чувствительность анализа с такими препаратами составляла 1 нг/мл (рис. 2). Использование именно таких конъюгатов в анализе ELISA-методом является наиболее эффективным, однако это касается лишь случаев, когда реализуется ферментное усиление. Когда же предполагается определение этого 2,4-Д иммунным анализом без ферментного усиления, а именно, путем прямой регистрации образования гаптен-антитело комплекса, то нам представляется более подходящим использование антител, полученных к БЯ-конъюгату, и других типов гаптен-белковых конъюгатов для участия в реакции конкуренции со свободным гаптенем за специфические центры связывания.

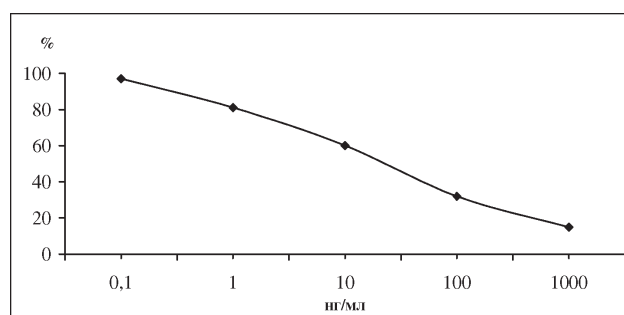


Рис. 2. Калибровальная кривая анализа 2,4-Д методом ELISA. Схема с меченым антигеном. По оси абсцисс — концентрация 2,4-Д, по оси ординат — процент связывания специфических IgG.

При разработке иммунного биосенсора на основе ФЛ ПК для определения низкомолекулярных токсических веществ типа НФ и 2,4-Д мы реализовали три основных варианта анализа, а именно: 1) конкурентный анализ, когда 2,4-Д- или НФ-конъюгат с БСА, или СИТ, или Ова был иммобилизован на поверхности ПК и конкурировал с соответствующим свободным гаптенем за специфические антитела, которые находились в растворе; 2) тоже, что в “1”, свободный 2,4-Д или НФ и их конъюгаты конкурировали за специфические антитела, иммобилизованные на ПК и 3) когда специфические антитела были иммобилизованы на повер-

хности ПК, а лишь один свободный 2,4-Д или НФ был в растворе.

Сначала было установлено время инкубации ПК со специфическими иммунными компонентами. При этом антитела, специфичные к 2,4-Д, и конъюгаты 2,4-Д с БСА использовали в концентрации 100 мг/мл. Площадь ПК была около 25 мм². Установлено, что скорость изменения ФЛ после 15 и 30 мин инкубации ПК с иммунными компонентами была значительно ниже, чем в случае продления этого времени до 60 и 90 минут. Однако одни и те же показатели были получены спустя 60 и 90 мин. В последующих экспериментах было установлено, какие концентрации иммунных компонент являются оптимальными для постановки анализа. В результате проведенных исследований было установлено, что оптимальной концентрацией есть 100 мг/л, а время физической сорбции равно 60 мин.

Далее было определено, какая может быть чувствительность анализа, если используются иммобилизованные специфические антитела, или конъюгат 2,4-Д с БСА, а другой компонент иммунной реакции находится в растворе. При этом концентрация одного из иммобилизуемых компонентов и время выдержки ПК в его растворе составляло 100 мг/л и 60 мин, соответственно. Концентрация ж второго иммунного компонента в анализируемом растворе изменялась от 0,1 мкг до 10 мг/л, а время контакта ПК с этим раствором было 15 мин. Установлено, что, если специфические IgG были иммобилизованы на поверхности ПК, то, удается регистрировать минимальную концентрацию 2,4-Д конъюгата с БСА на уровне 1 мкг/л, а линейный участок изменения интенсивности ФЛ ПК от концентрации этого конъюгата лежит в пределах 1-100 мкг/л. К сожалению, если мы заменили 2,4-Д-конъюгат на свободный 2,4-Д, то чувствительность анализа была очень низкой. Разработаны следующие алгоритмы анализа: а) конкурентный, когда свободный 2,4-Д и его конъюгат с БСА конкурировали за антитела, иммобилизованные на ПК; б) такой же как в "а", но свободный 2,4-Д и его конъюгат с БСА, иммобилизованный на ПК, конкурировали за антитела в растворе.

В случае, когда свободный и конъюгированный с БСА 2,4-Д конкурировали за антитела иммобилизованные на ПК, чувствитель-

ность анализа была на уровне 5 мкг/л, а линейный участок зависимости изменения интенсивности ФЛ ПК от концентрации свободного 2,4-Д находился в пределах 5-200 мкг/л. Если конъюгированный с БСА 2,4-Д был иммобилизован на ПК, а свободный 2,4-Д и специфические антитела находились в анализируемом растворе, то чувствительность анализа колебалась в пределах 1 мкг/л (рис. 3).

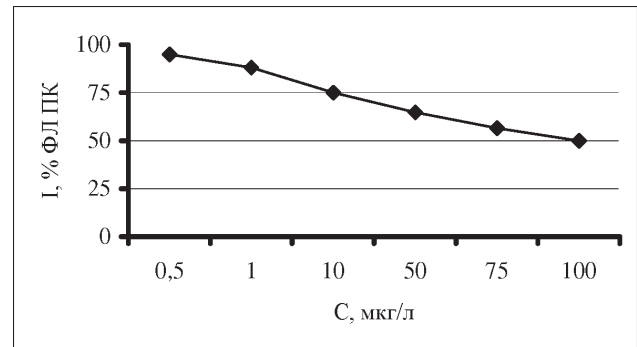


Рис. 3. Изменение интенсивности ФЛ ПК при анализе свободного 2,4-Д в растворе. 2,4-Д, конъюгированный с БСА был иммобилизован на поверхности ПК. Время инкубации в анализируемом растворе — 30 мин. Остальные пояснения в тексте.

Чувствительность определения НФ конкурентным способом и в случае иммобилизации НФ, конъюгированного с БСА, на поверхности ПК составила 10 мкг/л (рис. 4). Оптимальные условия определения НФ с помощью разработанного иммунного биосенсора на основе ФЛ ПК были в основном такие же, как и для 2,4-Д. Но поскольку в этом случае мы использовали не фракцию специфических IgG, а антисыворотку, то необходимо было, прежде всего, установить, какое же ее разведение является оптимальным для работы иммунного биосенсора. Оказалось, что предоставленные нам образцы антисывороток могут быть разбавлены в 7500 раз, поскольку в таком случае мы получали 50%-ный отклик иммунного биосенсора.

В заключение вернемся к объяснению возможного механизма изменения ФЛ ПК при образовании на его поверхности специфического иммунного комплекса. Как уже указывалось выше, мы придерживаемся гипотезы, согласно которой этот иммунный комплекс захватывает протон с поверхности ПК. Экспериментируя с определением небольших антигенов (гаптенов) мы пришли к выводу, что по-

мимо захватывания протона иммунным комплексом, он еще может стерически блокировать рекомбинантные центры на поверхности ПК. Об этом свидетельствуют данные, приведенные на рис. 5. Оказывается, что интенсивность ФЛ ПК изменяется при образовании специфическими антителами, иммобилизованными на его поверхности, комплекса с гаптенами, но это наблюдается лишь при больших концентрациях гаптенных в анализируемом растворе. В тоже время конъюгаты гаптенных с белками способны вызывать изменения ФЛ ПК при значительно меньшей концентрации, что указывает на их большую эффективность для индуцирования этого процесса.

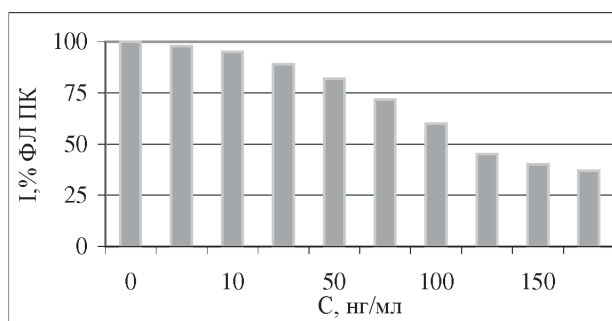


Рис. 4. Зависимость отклика иммунного биосенсора на основе ФЛ ПК от концентрации НФ в анализируемом растворе (объяснения см. текст).

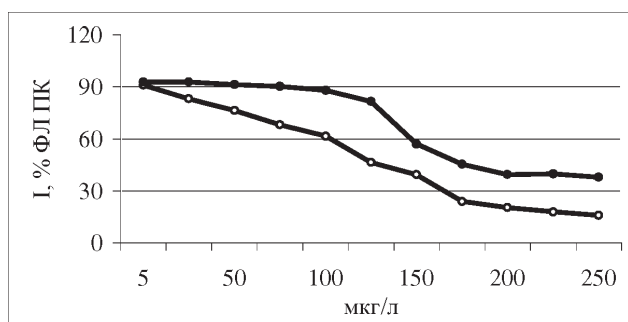


Рис. 5. Изменение интенсивности ФЛ ПК при анализе 2,4-Д с помощью конкурентного (1) и прямого (2) анализа. Время инкубации в анализируемом растворе — 15 минут, концентрация 2,4-Д, конъюгированного с БСА — 100 мкг/л.

Таким образом, разработанные иммунный биосенсор на основе ФЛ ПК может обеспечить не только высокочувствительное, быстрое и простое обнаружение высокомолекулярных веществ, но и таких низкомолекулярных соединений, как гербициды типа 2,4-Д и НФ.

Разработка таких биосенсоров способствует развитию перспективного для практики направления по созданию аналитических устройств, которые наиболее приближены к ее требованиям, а именно по обеспечению высокочувствительного, быстрого, простого и дешевого анализа. Вместе с тем, развития этого направления представляет особый интерес для фундаментальной науки, поскольку оно затрагивает важные вопросы, связанные с физикохимией формирования специфических иммунных комплексов, а также природой ФЛ ПК.

Список литературы

1. Стародуб Н. Ф., Стародуб В. М. Биосенсоры на основе фотолюминесценции пористого кремния. Общая характеристика и применение для медицинской диагностики. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. — 2004. — № 2. — С. 63-83.
2. Tanasijevic M. J., Winkelman J. W., Antman E. M. et al. Myoglobin, creatine kinase MB, and cardiac troponin-I to assess reperfusion after thrombolysis for acute myocardial infarction: results from TIMI 10A // *Americ. Heart J.* — 1997. — V. 134, N4. — P. 622-630.
3. Starodub V. M., Fedorenko L. L., Starodub N. F. Optimal immune sensors for the monitoring protein substances in the air // *Sensors and Actuators B*. — 2000. — V. 68. — N 1-3. — P. 40-47.
4. Starodub V. M., Dibrova T. L., Kostjuevich K., Shirshov Y. M., Starodub N. F. Optical sensors for medical diagnostics and environmental monitoring // In: *Lecture notes of the ICB seminars "Measurements and microtechnology for determination of (bio)chemical quantities in medical and environmental monitoring"*, March, 1998, Warsaw, Poland. Ed. P. Bergveld, W. Torbicz. International centre of biocybernetics. — 1998. — P. 192-205.
5. Starodub V. M., Kursky M. D. and Starodub N. F. Control of biological contamination of the air using bioaffinic sensor based on the photoluminescence of porous silicon // In: *Book of abstracts of 2-nd Euroconference on Environmental Analytical Chemistry: "Environmental Analytical Chemistry for the protection of sensitive ecosystems"*, Oct. 31 — Nov. 6, Cordoba, Spain. — 1998. — P. 47.
6. Starodub V., Urge-Vorsatz D. and Starodub N. A new method based on a bioaffinic sensor utilizing the photoluminescence of porous silicon to monitor protein substances in the air // In: *Proc. of the E-MRS'99 Spring Meeting "Microcrystalline & Na-*

- nocrystalline Semiconductors”, 1-4 June, 1999, Strasbourg, France. — 1999. — V. I-I. — P. 13.
7. Starodub N. F., Starodub V. M. and Artjuch V. P. Fiber optic immune sensor based on the enhanced chemical luminescence for the control of environmental contamination by biological substances // In: Proc. of the E-MRS'99 Spring Meeting “Microcrystalline & Nanocrystalline Semiconductors”, 1-4 June, 1999, Strasbourg, France. — 1999. — V. I-IV. — P. 21.
 8. Starodub V. M. Optical immune sensors for the express monitoring of the air contamination by biological substances // In: Proc. of NATO Advanced Study Institute “Human Monitoring after Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents”. Sept. 23 –Oct. 3, 1999, Tecirova-Antalya, Turkey. — 1999. — P. 81-82.
 9. Starodub N. F., Arenkov P. J., Starodub A. N. Fiber optic immunosensors based on enhanced chemiluminescence and their application to determine different antigens // *Sensors and Actuators B*. — 1994. — N18-19. — P. 161-165.
 10. Starodub N. F., Arenkov P. Ya., Rachkov A. E., Berezin V. A. Optoimmunosenors for analysis of specific and non-specific classes of immunoglobulins // *Ibid.* — 1992. — N7. — P. 371-375.
 11. Министерство здравоохранения РСФСР. Определение бревибактерий-продуцентов лизина в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Методические рекомендации (с правом переиздания местными органами здравоохранения). 1989. Москва. 18 с.
 12. Министерство здравоохранения СССР, Главное Управление Микробиологической промышленности при Совете Министров СССР, Ленинградский Государственный Орден Ленина Институт Усовершенствования врачей имени С. М. Кирова, Всесоюзный центр по глубоким микозам и микогенной аллергии минздрава СССР, Всесоюзный Научно-Исследовательский институт биосинтеза белковых веществ. Методические указания по оценке загрязненности окружающей среды выбросами предприятий микробиологической промышленности при производстве паприна с помощью иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума. Москва-Ленинград. — 1984. — 25 с.
 13. Міністерство охорони здоров'я України. Методичні вказівки N 0041 — 98 по вимірюванню концентрацій бластолену у повітрі робочої зони спектрофотометричним методом. — 1997. — Київ. — 7 с.
 14. Nazarenko V. I., Starodub N. F. Biosensoric control of pesticides in environment. Proceedings “Bioresources, biotechnology, innovations of Russia Southern”, Materials of International scientific practical conference, 21-24 October 2003, Stavropol-Pjatigorsk, 2003. — part. 1. — P. 309-313.
 15. Starodub N. F. Biosensors for the determination of individual and group specific low weight toxic elements and for the control of total toxicity of water before and after its purification // In: NATO ARW Abstract Book: Modern tools and methods of water treatment for improving living standards. Dnipropetrovsk, Ukraine, 19-22 November 2003.
 16. Starodub N. F., Katzev A. M., Starodub V. M., Levkovetz I. A., Goncharuk V. V., Klimenko N. A., Shmir'ova A. N., Piven N. V., B. B. Dzantijev Biosensors for water quality monitoring // In NATO Proceedings Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards, Dnipropetrovsk, Ukraine (In press).
 17. Starodub N. F., Demchenko A., Starodub V. M., Dmitrenko N. P., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Goncharic A. V., Piven N. V. Creation of optical immune sensors for the determination of low weight toxic substances in environment // OPTO'2004 Conference, Nuremberg, Germany, 25-27 May, 2004 (In press).
 18. Starodub N. F., Demchenko A., Starodub V. M., Dmitrenko N. P., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Goncharic A. V., Piven N. V. Optical immune sensors for the determination of low weight toxic substances in environment // International Scientific-technical Conference “Sensors Electronics and Microsystems Technology (SEMST-1)”, Ukraine, Odessa, June 2-6, 2004 (In press).
 19. Starodub N. F., Starodub V. M., Dzantiev B. B., Piven N. V. Determination of low weight toxic substances by optical immune sensors based on porous silicon // In Abstracts of International Conference “Porous Semiconductors — Science and Technology” (PSST-2004), Spain, 2004.
 20. Діброва Т. Л., Кривенчук В. Є, Никитенко А. П., Стародуб Н. Ф. Твердофазний конкурентний імуноферментний аналіз пестициду 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти // *Современные проблемы токсикологии*. — 2003. — №4.
 21. Антитела. Методы: Кн. 1: Пер. с англ. /Под. ред. Д. Кэтти. — М.: Мир, 1991. — С. 105-106.
 22. Еремін С. А. Иммунохимический анализ лекарственных и органических соединений // *Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*. — 1989. — Т. 34. — №1. — С. 46-51.