

На правах рукописи

Жил

МАЛЫШЕВА Наталья Николаевна

**РАЗРАБОТКА ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ESCHERICHIA COLI И АНТИГЕНА ВИРУСА КОРИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ Fe_3O_4**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химико-технологического института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Матерн Анатолий Иванович

Официальные оппоненты: **Евтюгин Геннадий Артурович,**
доктор химических наук, профессор,
ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», заведующий кафедрой
аналитической химии Химического института им.
А.М. Бутлерова

Стожко Наталия Юрьевна,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Уральский государственный
экономический университет», заведующая кафедрой
физики и химии Института торговли, пищевых
технологий и сервиса

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Защита состоится 13 октября 2015 г. в 15 ч 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.285.09 на базе ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира 19, зал Ученого совета (И-420).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»: <http://dissovet.science.urfu.ru/news2/>

Автореферат разослан « ___ »

2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Ямщиков Леонид Федорович

Общая характеристика работы

Актуальность работы. В связи с увеличением плотности населения, проблема инфекционного загрязнения биологических и природных объектов актуальна как для стран «третьего мира», так и для развитых стран. Быстрое обнаружение инфекционных агентов чрезвычайно важно для эффективной профилактики и лечения бактериальных и вирусных инфекций.

В медицинской практике для идентификации и определения концентрации бактерий и вирусов в различных объектах используются методы: бактериального посева, ПЦР, ИФА. Основными недостатками метода бактериального посева являются его длительность (от 3-х дней) и высокие требования к стерильности лаборатории. Опосредованное определение возбудителя инфекции методом ИФА путем измерения количества выработавшихся антител может дать искаженный результат в случае запоздалого или слабого иммунного ответа организма. Кроме того, ИФА требует применения нестабильных при хранении ферментов. При анализе методом ПЦР существует вероятность получения ложноположительных результатов, т.к. данный метод не способен «отличить» мертвую инфекцию от живой. Актуальным вопросом является разработка недорогих экспрессных методов, которые возможно реализовать в небольших лабораториях, в полевых условиях или «у постели» больного.

Степень разработанности темы исследования. Применение для детекции инфекционных агентов электрохимических методов, позволяющих быстро и с высокой точностью определять различные аналиты в объектах биологического и природного происхождения, с использованием относительно недорогого оборудования, активно обсуждается в литературе. С другой стороны, еще одним перспективным направлением является использование в разработке методов обнаружения инфекционных агентов наноматериалов. Особый интерес представляет применение нанокompозитных частиц, сочетающих в себе магнитное ядро и функциональное полимерное покрытие. Сочетание простоты, доступности и чувствительности электрохимических

методов с последними достижениями в области нанотехнологий позволит разработать новые экспрессные, чувствительные и селективные методы и сенсоры, а также исключить применение ферментов при определении бактерий и вирусов.

Цель работы. Разработка бесферментного электрохимического иммуносенсора и метода для количественного определения:

– бактерий (на примере *E.coli* ATCC 25922) с использованием нанокompозитных частиц Fe_3O_4 с электроактивным покрытием в качестве сигналообразующей метки;

– антигенов вирусов (на примере антигена вируса кори NovO/96) с использованием конъюгатов антител и магнитных нанокompозитных частиц.

Сочетание магнитных свойств Fe_3O_4 и электроактивного покрытия нанокompозита (НК), генерирующего прямой стабильный, хорошо выраженный электрохимический сигнал, даст возможность упростить, удешевить и ускорить процедуру определения бактерий в биологических и природных объектах. Синтез и применение конъюгатов антител с магнитными НК позволит разработать простой и чувствительный метод определения антигенов вирусов.

Научная новизна работы

1. Методом электронной микроскопии исследованы размер, форма и степень агрегированности синтезированных по оригинальным методикам НК на основе Fe_3O_4 , с электроактивным покрытием (полипиррол; поливинилбензилхлорид, модифицированный хинолином; оксид кремния, модифицированный ферроценом), а также скорость и мера проникновения их в клетку бактерии *E.coli*. Установлено, что размер НК зависит от используемого метода полимеризации. Метод эмульсионной полимеризации и золь-гель метод, в отличие от метода *in-situ*, позволили получить НК размером < 100 нм. Показано, что степень и скорость проникновения в клетку зависит от природы покрытия НК.

2. Исследованы электрохимические свойства НК. Показано, что все виды синтезированных НК проявляют электрохимическую активность в рабочем

диапазоне потенциалов водных растворов от -1 до +1 В, что позволяет использовать их в качестве сигналообразующей метки в водных средах.

3. Впервые показана возможность использования в электрохимическом бесферментном иммуноанализе синтезированных магнитных НК в качестве «прямой» сигналообразующей метки. Установлена линейная зависимость между величиной прямого электрохимического отклика НК – «метки», входящей в состав иммунокомплекса и концентрацией бактерий в пробе. Установлено оптимальное время инкубации НК с бактериями и время образования иммунокомплекса.

4. Найдены оптимальные условия проведения процедуры иммуноанализа, обеспечивающие экспрессное ($t_{\text{анализа}} = 60$ мин), чувствительное (диапазон линейности $2.3 \cdot 10^2 - 2.3 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) и специфичное количественное детектирование бактерий *E.coli*. Показана применимость разработанного подхода к определению содержания *E.coli* в реальных объектах (пробах воды и воздуха). Установлено, что на результат количественного определения целевого анализита не влияет присутствие в пробе бактерий других видов.

5. Показана и обоснована возможность применения разработанного гибридного варианта иммуноанализа с использованием конъюгатов антител с магнитными НК, для селективного определения антигена вируса кори в модельной системе. Установлено влияние на величину сигнала времени инкубации конъюгата с антигеном и времени образования «сэндвич» - иммунокомплекса.

Практическая значимость работы

1. Получены по оригинальным методикам электрохимически активные НК с узким распределением по размерам, определенной формы, состава, структуры и конъюгаты антител с НК на основе Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием.

2. С использованием предложенного иммуносенсора и алгоритма гибридного иммуноэлектрохимического метода анализа, с применением синтезированных электроактивных нанокompозитных частиц, разработан метод иммуноанализа для определения бактерий.

3. Проведены исследования по сравнительному определению содержания бактерии *E.coli* в модельных и реальных объектах с использованием разработанного иммуносенсора и традиционно-используемых методов ИФА и бактериального посева.

4. Разработан подход к определению антигенов вирусов методом электрохимического иммуноанализа с использованием конъюгатов антител с НК.

Положения, выносимые на защиту

1. Оригинальные методики получения стабильных во времени электрохимически активных НК на основе Fe_3O_4 с хинолин-модифицированным поливинилбензилхлоридным покрытием, покрытием из полипиррола, ферроценмодифицированным оксидкремниевым покрытием с узким распределением по размерам, определенной формы, состава, структуры.

2. Результаты ИК-спектроскопии подтверждающие наличие электроактивного полимерного покрытия на наночастицах Fe_3O_4 .

3. Результаты исследований размеров, формы и морфологии синтезированных НК, полученные с помощью микроскопии высокого разрешения с электронной дифракцией и метода динамического светорассеяния.

4. Результаты электрохимических исследований синтезированных НК.

5. Результаты исследования взаимодействия синтезированных НК на основе Fe_3O_4 с различными электроактивными полимерными покрытиями с культурой бактерии *E.coli*.

6. Иммуносенсор и метод электрохимического определения содержания бактерии *E.coli*.

7. Результаты определения с использованием разработанного иммуносенсора и метода содержания бактерии *E.coli* в реальных объектах, подтвержденные данными полученными в независимой лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск) методами ИФА и бактериального посева.

8. Метод электрохимического иммуноанализа для определения антигенов вирусов на примере антигена вируса кори NovO/96.

Работа является частью исследований, проводимых на кафедре аналитической химии ХТИ УрФУ в рамках госбюджетной темы Н687.42Г.002/12, поддержана грантами РФФИ: 09-03-12242-офи_м, 14-03-01017, грантом У.М.Н.И.К. (тема №9, проекта 14151).

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием при исследованиях современных методов и приборов и подтверждена сравнением полученных результатов с данными, полученными в независимой лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск) с использованием стандартно-применяемых для анализа подобных систем методов ИФА и бактериального посева.

Основные результаты исследований представлены на конференциях: «Аналитическая химия – новые методы и возможности» (Москва, 2010), «Теория и практика электроаналитической химии» (г. Томск, 2010), «9-th spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, Electrochemical Sensors: from nanoscale engineering to industrial application» (Турку, Финляндия, 2011), «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2011), «ЭМА-2012» (Абзаково, 2012), «Nanoformulation – 2012» (Барселона, Испания, 2012), «Химия и медицина» (Уфа, 2013), «Второй съезд аналитиков России (Москва, 2013), «Современные проблемы органической химии» (Екатеринбург, 2014).

Публикации. По результатам исследований опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК, 2 патента и 14 тезисов докладов на конференциях различного уровня.

Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоял в решении ключевых задач, проведении основных экспериментальных исследований в области синтеза и модификации НК, в изучении их электрохимического поведения, интерпретации, систематизации результатов, разработке метода и сенсора для электрохимического определения бактерии *E.coli* и антигена вируса кори.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5-ти глав, выводов, списка использованных библиографических источников (194 источника). Изложена на 147 страницах компьютерной верстки, содержит 37 рисунков, 14 таблиц.

Во введении раскрыта актуальность и степень разработанности темы исследования, определены цели и задачи, сформулирована научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ литературных данных о современном состоянии методов определения бактериальных патогенов в модельных и реальных объектах. Особое внимание уделено рассмотрению биосенсоров и их применению для идентификации инфекционных агентов. Рассмотрены варианты использования в иммуноанализе наночастиц и нанокompозитов.

Во второй главе представлены сведения о реагентах, материалах и оборудовании, использованных в работе. Изложены методики синтеза НК на основе Fe_3O_4 с электроактивным полимерным покрытием на основе полипиррола, модифицированного хинолином поливинилбензилхлорида, модифицированного ферроценом оксида кремния. Приведены методики подготовки образцов для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии НК и клеток *E.coli* после взаимодействия с НК.

Третья глава посвящена синтезу и результатам ИК-спектроскопии, подтверждающим состав синтезированных НК на основе Fe_3O_4 с электроактивным покрытием, результатам определения методом просвечивающей электронной микроскопии размера и формы НК и исследованию их электрохимических свойств.

Четвертая глава посвящена разработке бесферментного электрохимического иммуносенсора и метода определения содержания бактерий *E.coli* в модельных и реальных объектах, с использованием синтезированных НК на основе Fe_3O_4 с электроактивным полимерным покрытием. Представлены результаты определения концентрации *E.coli* в

модельных и реальных пробах разработанным методом и референсными методами: ИФА и бактериального посева.

Пятая глава посвящена разработке метода бесферментного иммуноанализа для определения антигенов вирусов с использованием синтезированных конъюгатов антител и НК.

Методология и методы исследования. При синтезе НК использовали методы соосаждения, полимеризации *in situ* и эмульсионной полимеризации. Морфологию, размерные характеристики НК и взаимодействие бактериальных клеток с НК изучали методом электронной микроскопии. Для исследования электрохимических свойств НК и при разработке метода иммуноанализа, использовали методы циклической и инверсионной вольтамперометрии.

Аппаратура и реактивы. Электрохимические исследования проводили с использованием вольтамперометрического анализатора ИВА-5 («ИВА», г. Екатеринбург) и потенциостата/гальваностата μ Autolab type III (Metrohm, Швейцария). Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку объемом 10 см³. В качестве вспомогательного электрода использовали стеклоуглеродный стержень, электрода сравнения - насыщенный Ag/AgCl электрод (Metrohm, Швейцария). В качестве рабочего электрода и твердой подложки для иммобилизации антител использовали толсто пленочный графито-эпоксидный электрод (ТГЭ) (Рисунок 1), хорошо зарекомендовавший себя в качестве основы для фиксации веществ белковой природы.

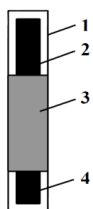


Рисунок 1 – Общий вид ТГЭ: 1 – подложка из полимерного материала; 2 – дорожка из графито-эпоксидной пасты (контактная зона электрода); 3 – слой изолятора; 4 – рабочая зона электрода.

В работе использовали верхнеприводную мешалку ИКА Eurostar digital 2482000, ультразвуковой гомогенизатор Ultrasonic processor 500W, инкубатор «GFL-4010» («Labortechnik», Германия). В синтезе наночастиц Fe₃O₄ и НК использовали магнит, сконструированный в институте физики металлов УрО РАН, с величиной магнитного поля 37.40×10^4 А/м. Для магнитной сепарации и

концентрирования НК применяли магнитный штатив «MagneSphere®» («Promega», США) с величиной напряженности магнитного поля 31.83×10^3 А/м.

Основные результаты и их обсуждение

1. Синтез нанокompозитных частиц

Для применения в иммуноанализе необходимо было получить НК постоянного состава с магнитным ядром и электроактивным покрытием, генерирующим стабильный сигнал, с размерами, позволяющими проходить сквозь клеточную мембрану бактерии (не >300 нм). По оригинальным методикам синтезированы три типа НК на основе наночастиц магнетита: с поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным хинолином (Fe_3O_4 – ХПВБХ) (Рисунок 2а); с покрытием из полипиррола (Fe_3O_4 – ПП) (Рисунок 2б); с модифицированным ферроценом оксидкремниевым покрытием (Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2) (Рисунок 2в).

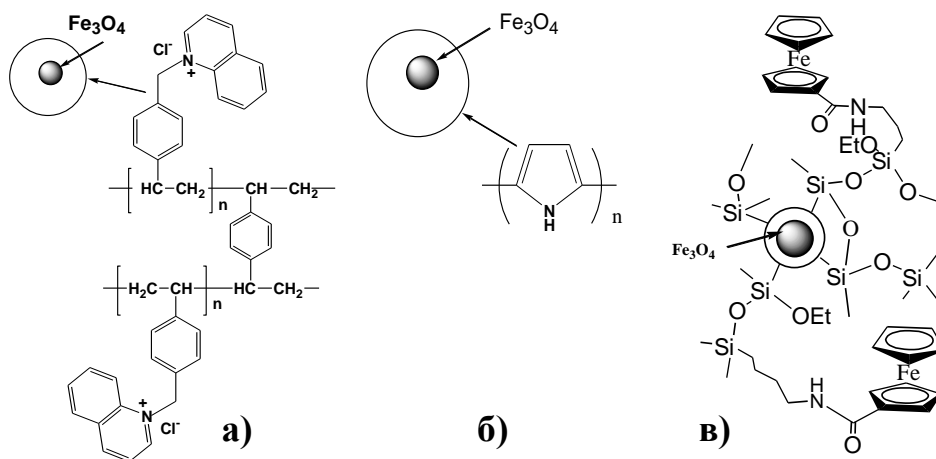


Рисунок 2 -
Строение
нанокompозитных
частиц Fe_3O_4 –
ХПВБХ (а), Fe_3O_4
– ПП (б), Fe_3O_4 –
ФЦ SiO_2 (в).

В процессе синтеза варьировали количественные соотношения реагентов с целью получения НК с различной толщиной покрытия. Для всех типов НК наличие полимерного покрытия подтверждено методом ИК-спектроскопии.

2. Микроскопические исследования НК

Проведены электронно-микроскопические исследования образцов НК, синтезированных при разных количественных соотношениях реагентов. На основании полученных данных (степени агрегированности, размера, толщины и равномерности покрытия) из всех образцов для дальнейшего исследования выбраны образцы НК, микрофотографии которых представлены на рисунке 3.

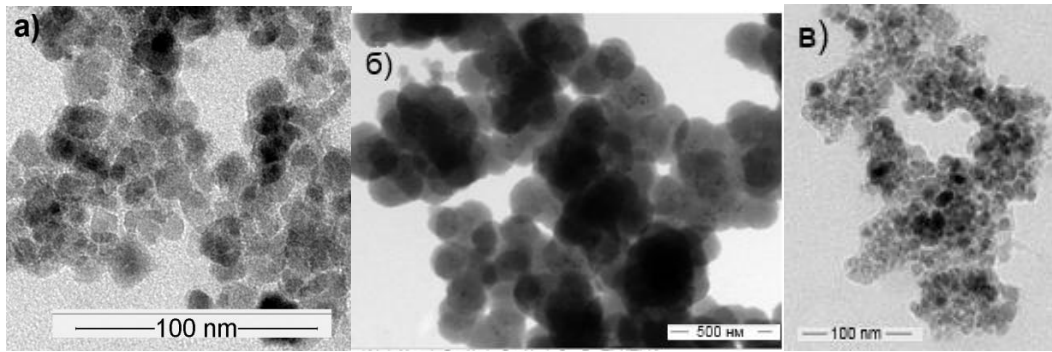


Рисунок 3 - Микрофотографии НК: Fe_3O_4 – ХПВБХ (соотношение компонентов $m_{\text{НЧ Fe}_3\text{O}_4}/m_{\text{винилбензилхлорида}}=1:10$) (а); Fe_3O_4 – ПП (соотношение $m(\text{НЧ Fe}_3\text{O}_4)/m(\text{пиррола})=1:1$) (б); Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 ($m(\text{НЧ Fe}_3\text{O}_4)/m(\text{ТЭОС})=1:1$) (в). Микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония).

НК с покрытием всех типов представлены сферическими образованиями. Темные области на микрофотографиях – магнетитные ядра НК (подтверждено методом электронной дифракции), оптически менее плотное «гало» вокруг более темного центра соответствует полимерному покрытию НК. Максимум распределения по размерам для НК Fe_3O_4 – ХПВБХ 20 нм, Fe_3O_4 – ПП – 170 нм, Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 20 нм.

Агрегативная устойчивость НК, диспергированных в воде, является одним из ключевых факторов при подборе оптимальной концентрации рабочей суспензии для использования в иммуноанализе. Методом динамического светорассеяния провели выбор устойчивой системы в серии суспензий каждого типа НК с разными концентрациями, предварительно обработанными УЗ. По результатам выбраны суспензии НК с концентрацией 0.25 г/л.

4. Электрохимические исследования выбранных образцов

При проведении электрохимических исследований образцов НК проводили модифицирование ТГЭ путем нанесения 10 мкл водной суспензии образца на поверхность рабочей зоны электрода с последующей сушкой на воздухе до полного испарения дисперсионной среды.

4.1 Электрохимическое поведение НК Fe_3O_4 – ХПВБХ

На рисунке 4 приведены циклические вольтамперограммы (ЦВА) зарегистрированные для НК Fe_3O_4 – ХПВБХ. В качестве аналитического сигнала выбран электрохимический отклик при потенциале ≈ -1.15 В. $I = 8 \cdot 10^{-7} \times C - 6 \cdot 10^{-6}$ ($S_r = 10.6\%$, при $n = 5$, $r = 0.97$).

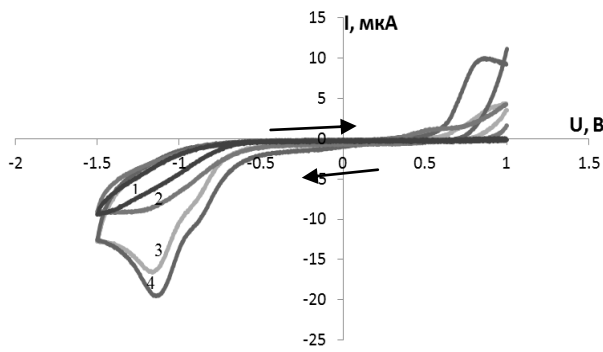


Рисунок 4 – ЦВА НК Fe_3O_4 – ХПВБХ: фон 0.1 М KNO_3 в воде (1); НК, нанесенный на ТГЭ (2 – 4): $C_{\text{мод}} = 4$ г/л (2), $C_{\text{мод}} = 10$ г/л (3), $C_{\text{мод}} = 14$ г/л (4). $v_{\text{рег-ии}} = 200$ мВ/с.

4.2 Электрохимическое поведение наноконкомпозитов Fe_3O_4 – ПП

На рисунке 5 приведены ЦВА зарегистрированные для НК Fe_3O_4 -ПП. В качестве аналитического сигнала выбран электрохимический отклик при потенциале $\approx (-0.15 - 0)$ В. $I = 2 \cdot 10^{-4} \times C - 3 \cdot 10^{-6}$ ($S_r = 7.2\%$ при $n = 5$, $r = 0.97$).

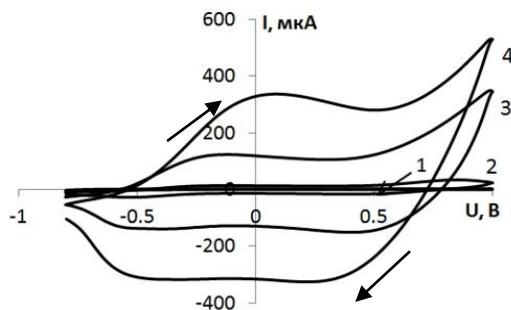


Рисунок 5 – ЦВА НК Fe_3O_4 – ПП. Фон 0.1 М KNO_3 (1); НК, нанесенный на ТГЭ (2 - 4): $C_{\text{мод}} = 0.25$ г/л (2), $C_{\text{мод}} = 0.75$ г/л (3), $C_{\text{мод}} = 1.5$ г/л (4). $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с.

4.3 Электрохимическое поведение наноконкомпозитов Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2

На рисунке 6 приведены ЦВА зарегистрированные для НК Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 . В качестве аналитического сигнала выбран электрохимический отклик при потенциале ≈ 0.55 В. $I = 7 \cdot 10^{-7} \times C - 5 \cdot 10^{-8}$ ($S_r = 8.3\%$ при $n = 5$, $r = 0.98$).

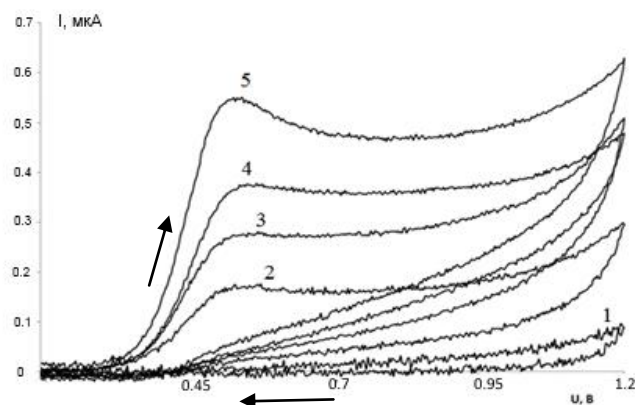


Рисунок 6 – ЦВА НК Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 . Фон 0.1 М KNO_3 в воде (1), НК, нанесенный на ТГЭ (2-5): $C_{\text{мод}} = 0.2$ г/л (2); $C_{\text{мод}} = 0.3$ г/л (3); $C_{\text{мод}} = 0.45$ г/л (4); $C_{\text{мод}} = 0.6$ г/л (5). $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с.

Таким образом, для всех трех НК, выбранных по результатам электронной микроскопии, были зарегистрированы аналитические электрохимические сигналы. Следующим этапом работы, являлось получение информации о взаимодействии синтезированных НК всех типов с бактерией *E.coli*.

5. Микроскопические исследования взаимодействия НК с *E.coli*

Были проведены исследования по взаимодействию суспензий всех типов синтезированных НК ($C_{исх}=0.25$ г/л) с бактериальной культурой *E.coli* АТС 25922. Инкубацию бактерий с НК проводили в стерильном физ.растворе, фиксируя препарат по истечении 10 и 30 минут. На рисунке 7 представлены микрофотографии клеток до взаимодействия с НК, на рисунке 8 – после.

На микрофотографиях среза бактериальных клеток после 10-ти минутной инкубации клеток *E.coli* с НК видно, что происходит адсорбция всех типов НК на мембране клетки или проникновение единичных частиц (Рисунок 8 а,в,д). После 30-ти минут (Рисунок 8 б,г,е), НК Fe_3O_4 – ХПВБХ остаются на мембране, Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 проникают в примембранное пространство, а частицы Fe_3O_4 – ПП, проходят глубоко в цитоплазму.

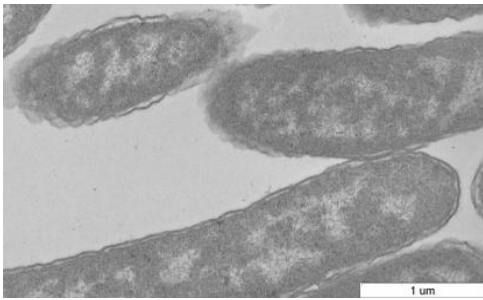


Рисунок 7 – Микрофотография ультратонкого среза клеточной культуры *E.coli* (микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)).

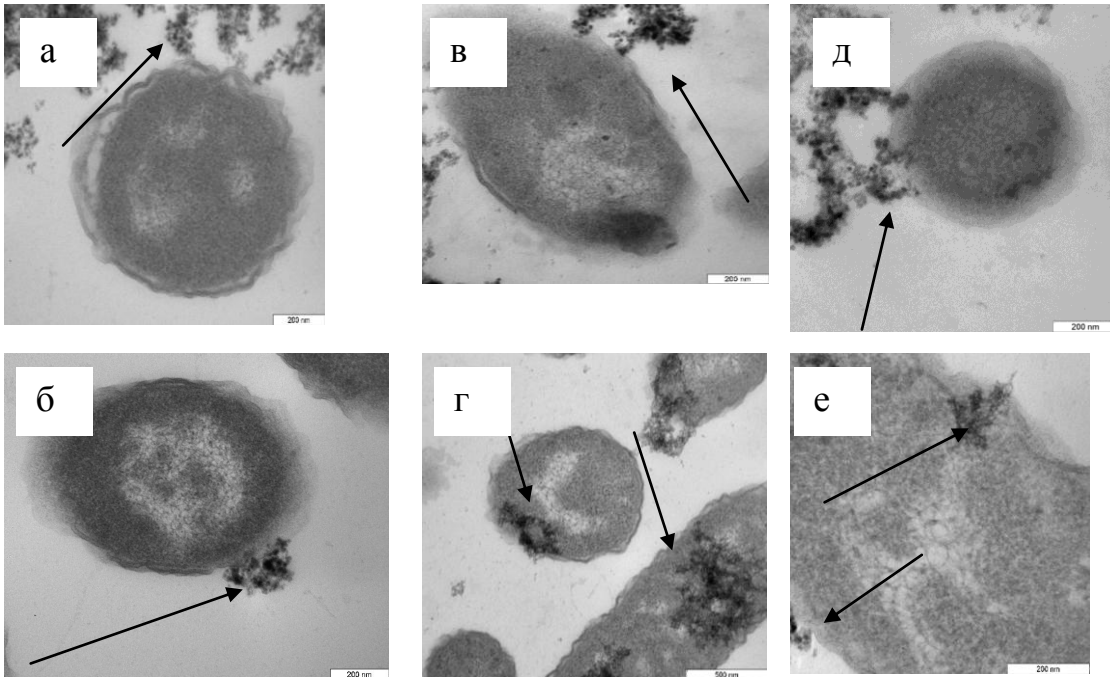


Рисунок 8 – Микрофотографии ультратонкого среза клеточной культуры *E.coli* после 10-ти (а, в, д) и 30-ти (б, г, е) минутной инкубации с нанокompозитными частицами Fe_3O_4 – ХПВБХ (а,б); Fe_3O_4 – ПП (в-г); Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 (д,е) (микроскоп JEM 1400 Jeol, Япония).

Проведенные исследования показали, что степень поглощения зависит от природы покрытия НК. С увеличением времени инкубации, количество НК, поглощенных клетками, возрастает. После прохождения клеточной стенки (иногда с её повреждением) частицы локализуются в объеме цитоплазмы клетки или во внутреннем примембранном пространстве.

6. Разработка сенсора и метода электрохимического иммуноанализа для определения содержания бактерий

Проведены исследования возможности использования синтезированных НК в качестве электрохимической «метки» для определения бактерий с использованием предложенной процедуры иммуноанализа (Рисунок 9).

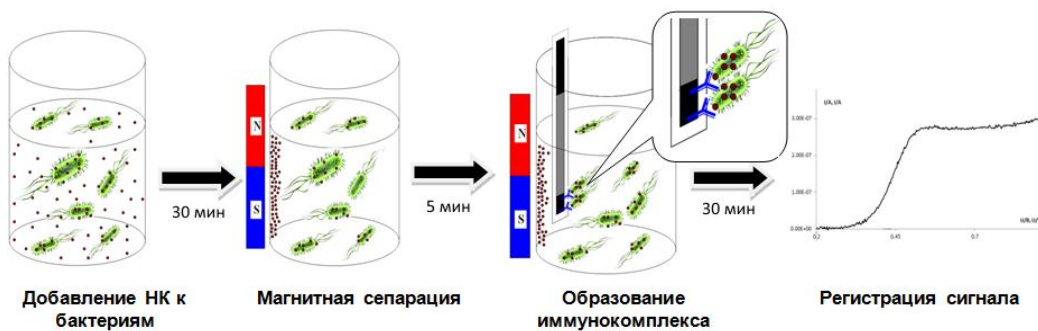


Рисунок 9 –
Схема
иммуноанализа

- К анализируемой суспензии, содержащей *E.coli*, добавляли суспензию НК и инкубировали в течение 30 мин в 0.9% NaCl при $T = (37 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$.
- Поместив пробирку в магнитный штатив, отделяли несвязавшиеся с бактериями НК.
- В пробирку вносили ТГЭ с предварительно иммобилизованными антителами к *E.coli* выдерживали при $T = (37 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут.
- ТГЭ с образовавшимся на рабочей поверхности иммунокомплексом помещали в трехэлектродную электрохимическую ячейку (в качестве рабочего электрода) и выполняли регистрацию вольтамперограммы на анализаторе.

В качестве холостого использовали опыт, когда модифицированный антителами ТГЭ инкубировали в растворе, не содержащем бактерий *E.coli*.

В ходе проведения процедуры иммуноанализа с использованием НК Fe_3O_4 – ХПВБХ в качестве сигналообразующей метки было установлено, что при

длительном нахождении НК (более 10 мин) в водных растворах происходит потеря электроактивности, что не позволяет использовать его в иммуноанализе.

После проведения процедуры иммуноанализа с использованием НК Fe_3O_4 – ПП сигналы на вольтамперограмме плохо выражены, несмотря на большую определяемую концентрацию *E.coli* ($6.4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл). Невыраженность сигналов может являться следствием быстрого и глубокого проникновения наночастиц внутрь бактериальной клетки (что согласуется с данными, полученными микроскопическим методом) и, как следствие, экранированием электроактивного соединения на поверхности частиц клеточным веществом, что не позволяет использовать данный тип НК в дальнейших исследованиях.

На рисунке 10 представлены ЦВА, зарегистрированные после проведения процедуры иммуноанализа по приведенной выше схеме с использованием НК Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 в качестве сигналообразующей метки.

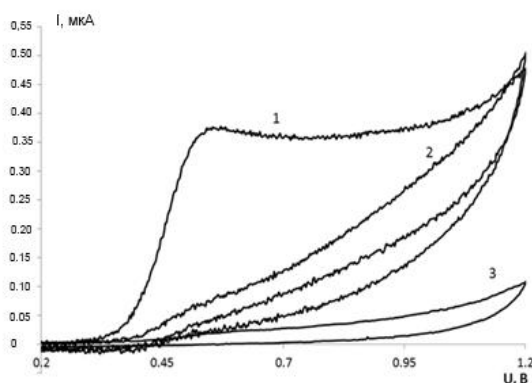


Рисунок 10 – ЦВА, зарегистрированные после проведения процедуры иммуноанализа в суспензиях, содержащих ($C_{E.coli} = 3.2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл) (1) и не содержащих (2) бактерии *E.coli*, меченые НК Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 ; фон 0.1 М KNO_3 (3).
 $v_{\text{рег-ни}} = 0.250$ В/с.

Таким образом, в предлагаемом методе иммуноанализа, выраженный электрохимический отклик зарегистрирован только для образца Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 . Для предложенного алгоритма были выбраны оптимальные времена инкубации и образования иммунокомплекса, составившие 30 мин.

Полученные результаты иммуноанализа согласуются с результатами электронно-микроскопических исследований. НК Fe_3O_4 – ФЦ SiO_2 после 30-ти минутной инкубации (рисунок 8 д, е), в отличие от НК Fe_3O_4 – ПП (проникающих в цитоплазму) (рисунок 8 в, г) остаются в примембранном пространстве клетки. Проникновение НК вглубь клетки не позволяет получить выраженный сигнал после реализации процедуры иммуноанализа.

Получена линейная зависимость величины аналитического сигнала от десятичного логарифма концентрации бактерий *E.coli* в исходной суспензии в соответствии со следующим градуировочным уравнением: I (мкА) = $0.0732 \pm 0.0013 \times \log C_{E.coli} - 0.203 \pm 0.007$ ($r = 0.98$). Предел обнаружения составляет $1.2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл.

В таблице 1 приведены аналитические сигналы, зарегистрированные при определении содержания *E.coli* в модельных суспензиях с использованием НК Fe₃O₄ – ФЦ SiO₂. Величины S_r не превышают 15% (при n=5). Таким образом, предложенный метод обеспечивает воспроизводимые результаты измерения бактерий *E.coli* в диапазоне концентраций $2.3 \cdot 10^2 - 2.3 \cdot 10^7$ КОЕ/мл.

Таблица 1 - Аналитические характеристики определения содержания бактерий *E. coli*, полученные в разные дни (n = 5, P = 0.95)

| Концентрация <i>E.coli</i> , КОЕ/мл | Аналитический сигнал $I \pm \Delta I$, мкА | | |
|-------------------------------------|---|------------------------|------------------------|
| | S _r , % | | |
| | 1 день | 2 день | 3 день |
| $2.3 \cdot 10^2$ | 0.0273±0.0100 14.79 | 0.0271±0.0105 14.89 | 0.0270±0.0106 14.95 |
| $2.3 \cdot 10^3$ | 0.0533±0.0190 14.23 | 0.0538±0.0186 14.11 | 0.0530±0.0194 14.5 |
| $2.3 \cdot 10^4$ | 0.1237±0.0314 10.24 | 0.1185±0.0310 10.11 | 0.1232±0.0320 10.47 |
| $2.3 \cdot 10^5$ | 0.1707±0.0397 9.38 | 0.1910±0.0385 9.31 | 0.1803±0.0391 9.70 |
| $2.3 \cdot 10^6$ | 0.2393±0.0448 7.54 | 0.2480±0.0480 8.62 | 0.2289±0.0491 9.1 |
| $2.3 \cdot 10^7$ | 0.3613±0.0658 7.33 | 0.3820±0.0621 6.35 | 0.3508±0.0661 7.55 |

6.1. Определение правильности, специфичности и селективности метода электрохимического иммуноанализа

С целью определения правильности разрабатываемого метода электрохимического иммуноанализа с использованием НК Fe₃O₄ – ФЦ SiO₂, методом «введено-найдено» проведен сравнительный анализ модельных суспензий, содержащих микроорганизм *E. coli* ATCC 25922, выполненный в независимой лаборатории методами ИФА и бактериального посева и разработанным нами электрохимическим методом (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительные результаты анализа модельных проб, содержащих *E.coli*, с помощью различных методов (n = 3, P = 0.95)

| Концентрация <i>E.coli</i> , КОЕ/мл | ИФА*, КОЕ/мл | Бактериальный посев*, КОЕ/мл | Электрохимический метод, КОЕ/мл |
|-------------------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------|
| $5 \cdot 10^6$ | $4.70 \cdot 10^6$ | $5 \cdot 10^6$ | $(4.6 \pm 0.3) \cdot 10^6$ |
| $5 \cdot 10^5$ | $5.32 \cdot 10^5$ | $5 \cdot 10^5$ | $(4.9 \pm 0.4) \cdot 10^5$ |
| $5 \cdot 10^4$ | $4.65 \cdot 10^4$ | $5 \cdot 10^4$ | $(4.7 \pm 0.4) \cdot 10^4$ |
| $5 \cdot 10^3$ | $5.65 \cdot 10^3$ | $5 \cdot 10^3$ | $(5.2 \pm 0.5) \cdot 10^3$ |
| $5 \cdot 10^2$ | $5.20 \cdot 10^2$ | - | $(4.8 \pm 0.6) \cdot 10^2$ |
| $5 \cdot 10^1$ | - | - | - |

*проведены в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск).

Из полученных результатов видно, что минимальная концентрация для бактерии *E.coli*, определяемая электрохимическим методом, составляет $\approx 10^2$ КОЕ/мл, что совпадает с возможностями ИФА анализа.

Проведены исследования специфичности разрабатываемого метода. ТГЭ с иммобилизованными антителами к *E. coli* инкубировали в двух суспензиях, одна из которых содержала микроорганизмы *E. coli* ATCC 25922, а другая *Salmonella infantis* B-1281. При инкубации в суспензии, не содержащей *E. coli* (содержащей *S. infantis*), откликов не наблюдалось, поскольку не происходило формирование иммунного комплекса на поверхности ТГЭ. Эти результаты подтверждают отсутствие влияния неспецифических взаимодействий и адсорбции на результат анализа.

С целью определения селективности электрохимического метода иммуноанализа были проанализированы модельные системы, в которых помимо бактерий *E.coli* содержалось бактерии другого вида (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительные результаты определения концентрации *E. coli* в смесях с бактерией другого вида (n = 3, P = 0.95)

| Состав смеси $C_{E.coli} = 7 \cdot 10^4$ КОЕ/мл $C_{2 \text{ компонента смеси}} \approx 10^4$ КОЕ/мл | Содержание бактерии <i>E.coli</i> , КОЕ/мл | | |
|--|--|------------------------------|----------------------------|
| | ИФА* | Метод бактериального посева* | Электрохимический метод |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + <i>Salmonella infantis</i> B-1281 | $8 \cdot 10^4$ | $\approx 7 \cdot 10^4$ | $(7.5 \pm 0.3) \cdot 10^4$ |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + <i>Micrococcus flavus</i> B-1132 | $6 \cdot 10^4$ | $\approx 6 \cdot 10^4$ | $(6.6 \pm 0.3) \cdot 10^4$ |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + <i>Bacillus licheniformis</i> B-299 | $6 \cdot 10^4$ | $\approx 8 \cdot 10^4$ | $(7.1 \pm 0.5) \cdot 10^4$ |

*проведены в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск).

Из таблицы видно, что результаты определения содержания *E.coli* с использованием разработанного иммуносенсора удовлетворительно согласуются с результатами определения методом ИФА и методом посева.

6.2. Анализ реальных объектов

Провели анализ реальных объектов разработанным методом и сравнительными методами ИФА и бактериального посева (Таблица 4).

Таблица 4 – Сравнительные результаты определения концентрации микроорганизмов *E. coli* в пробах воды и воздуха (n = 3, P = 0.95)

| Проба | Результат определения бактерии <i>E. coli</i> , КОЕ/мл | | |
|--|--|------------------------------|----------------------------|
| | ИФА* | Метод бактериального посева* | Электрохимический метод |
| Проба воздуха | Не обнаружено | Не обнаружено | Не обнаружено |
| Вода из природного водоема (р.п. Кольцово, Новосибирская область) Дата пробоотбора 30.07.2014. | $1 \cdot 10^3$ | $\approx 10^3$ | $(9.4 \pm 0.3) \cdot 10^2$ |
| Вода из искусственного водоема (г. Новосибирск) Дата пробоотбора 30.07.2014. | $5 \cdot 10^2$ | - | $(5.2 \pm 0.3) \cdot 10^2$ |

*проведены в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск).

Приведенные данные подтверждают корректность использования для определения бактерии *E.coli* в реальных объектах разработанного электрохимического метода и иммуносенсора.

7. Применение НК с оксидкремниевым покрытием, модифицированным антителами ($\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{ATSiO}_2$) для определения антигенов вирусов

Разработан метод определения антигенов вирусов (на примере антигена вируса кори) с использованием синтезированных конъюгатов антител к вирусу кори с НК на основе Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием (Рисунок 11).

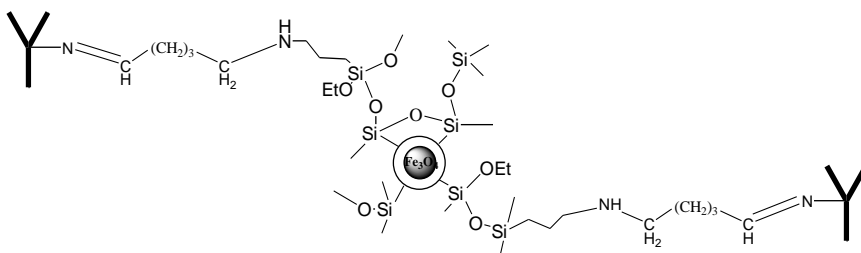
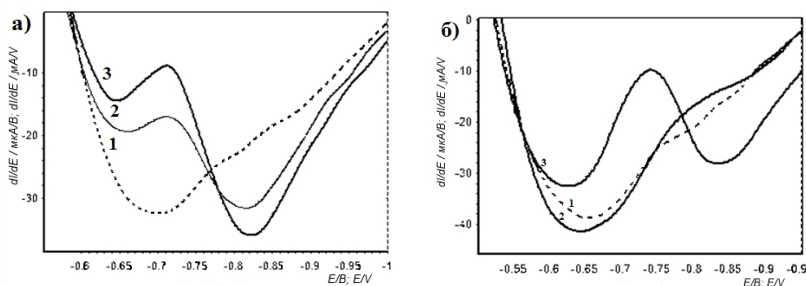


Рисунок 11 - Конъюгат антител к вирусу кори с НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{ATSiO}_2$.

Была разработана следующая схема иммуноанализа:

- На рабочей зоне графитовой подложки иммобилизовали антитела к вирусу кори.
- Подложку помещали в пробирку с пробой, содержащей антиген вируса кори и инкубировали при $T=(37\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин.
- Далее в пробирку добавляли конъюгат НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{ATSiO}_2$ и инкубировали для образования «сэндвич» - иммунокомплекса на поверхности подложки.
- Проводили разрушение иммунокомплекса методом кислотного разложения, в результате которого магнетит переходит в ионы Fe^{3+} , концентрация которых определялась вольтамперометрическим методом.

В случае, если в анализируемом растворе содержался антиген, на вольтамперограмме наблюдали появление пика восстановления ионов Fe^{3+} (Рисунок 12а). В холостом опыте изменения фонового тока не происходило (Рисунок 12б), вследствие отсутствия образования иммунокомплекса. Также полученные результаты свидетельствуют об отсутствии неспецифического связывания конъюгатов $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{AT SiO}_2$ с подложкой.



$E_{\text{нак}} = 0.1 \text{ В}$, $t_{\text{нак}} = 60 \text{ с}$, $v_{\text{рег-ии}} = 0.5 \text{ В/с}$. Фон: 0.1 моль/дм^3 раствор CH_3COONa ($\text{pH } 7.5$), $5 \cdot 10^{-4} \text{ моль/дм}^3$ пирокатехола.

Рисунок 12 – Производные вольтамперограмм Fe^{3+} , зарегистрированные после анализа проб, содержащих (а) и не содержащих антиген вируса кори (б): фон (1); проба (2); проба+ добавка ГСО Fe^{3+} (3). $C_{\text{антигена}} = 2.33 \cdot 10^{-2} \text{ мг/мл}$.

Получена линейная зависимость изменения величины аналитического сигнала от логарифма концентрации антигена вируса кори в интервале концентраций $2.33 \cdot 10^{-4} - 2.33 \text{ мг/мл}$: $dI/dE [\text{мкА/В}] = 2.441 \pm 0.002 \times \log C_{\text{антигена}} - 11.63 \pm 0.05$ ($r = 0.967$). Предел обнаружения составляет $1.87 \cdot 10^{-5} \text{ мг/мл}$.

Установленные значения коэффициентов воспроизводимости и повторяемости не превышают 0.01. Таким образом, предложенный метод обеспечивает воспроизводимые результаты определения содержания антигена вируса кори в диапазоне концентраций $2.33 \cdot 10^{-4} - 2.33 \text{ мг/мл}$.

Для оценки специфичности разработанного метода проводили анализ по предложенной схеме, однако вместо антигена вируса кори использовали антиген вируса клещевого энцефалита. Откликов не наблюдали, поскольку иммунокомплекс на поверхности ТГЭ не формировался, что подтверждает отсутствие влияния на аналитический сигнал неспецифических взаимодействий и адсорбции. Таким образом, можно заключить, что данная процедура анализа с использованием НК на основе Fe_3O_4 в качестве сигналообразующей метки, позволяет определять содержание антигена вируса кори в модельном растворе с минимальной концентрацией $1.85 \cdot 10^{-5}$ мг/мл.

ВЫВОДЫ

1. С использованием оригинальных методик синтезированы НК на основе магнетита (Fe_3O_4) с полимерным покрытием из полипиррола (средний размер 170 нм); поливинилбензилхлорида, модифицированного хинолином (средний размер 20 нм); оксида кремния модифицированного ферроценом / антителями (средний размер 20 нм). Структура и размерность каждого вида НК подтверждены методом ИК-спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения с электронной дифракцией.

2. Исследована возможность применения магнитных НК на основе Fe_3O_4 с электроактивным покрытием в качестве «метки», генерирующей адекватный, чувствительный, легко измеряемый аналитический электрохимический отклик.

3. Показано взаимодействие синтезированных НК всех типов с клетками бактерии *E.coli*.

4. Разработаны новый электрохимический иммуносенсор и метод определения бактерий (на примере *E.coli* штамм АТС 25922) с использованием нанокompозитных частиц Fe_3O_4 – ферроценмодифицированный оксид кремния в качестве метки в диапазоне концентраций $2.3 \cdot 10^2$ - $2.3 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Предел обнаружения составляет $1.2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл.

5. Надежность и правильность результатов определения содержания *E.coli* в модельных системах и реальных объектах (пробы воды и воздуха)

подтверждены сравнением данных полученных с применением разработанного и стандартных методов (бактериального посева и ИФА).

6. Разработан метод электрохимического определения антигенов вирусов (на примере антигена вируса кори) с использованием конъюгатов антител с нанокompозитными частицами $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{SiO}_2$ в диапазоне концентраций $2.33 \cdot 10^{-4} - 2.33$ мг/мл. Предел обнаружения составляет $1.87 \cdot 10^{-5}$ мг/мл.

Автор выражает благодарность к.х.н., доценту Козициной А.Н. за помощь в постановке исследований и анализе полученных экспериментальных данных; сотрудникам лаборатории ГС ИОС УрО РАН и кафедры органической химии ХТИ УрФУ за помощь в разработке методик синтеза НК, сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск) за помощь в проведении работ с культурами бактерий и электронно-микроскопические исследования.

Основные публикации по теме диссертационной работы

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК

1. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический метод определения *E.coli* с использованием нанокompозитов Fe_3O_4 с оболочкой SiO_2 , модифицированной ферроценом / А.Н. Козицина, Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина, О.Н. Чупахин // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70. – № 5. – С. 1-7 (2,3 п.л./ 0,4 п.л.).

2. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический метод определения антигена вируса кори с использованием синтезированных конъюгатов IgG – ($\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{SiO}_2$) в качестве сигналообразующей метки / Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, В.О. Ждановских, Т.С. Свалова, А.И. Матерн, А.Н. Козицина // Известия РАН. Серия химическая. – 2014. – № 7. – С. 1633-1638 (2,1 п.л./ 0,4 п.л.).

3. Малышева, Н.Н. Синтез и исследование электрохимических превращений магнитных нанокompозитов на основе Fe_3O_4 / А.Н. Козицина, Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, Т.С. Митрофанова, Г.Л. Русинов, А.И. Матерн, О.Н. Чупахин, Х.З. Брайнина // Известия РАН. Серия химическая. – 2013. – № 1. – С. 2327-2336 (2,1 п.л./ 0,3 п.л.).

Патенты РФ:

4. Пат. 2542487 РФ. МПК C12Q 1/04, C12N 1/02, G01N 33/53, B82B 1/00
Способ определения содержания грамотрицательных патогенных бактерий в анализируемой среде / Козицина А.Н., Малышева Н.Н., Глазырина Ю.А., Матерн А.И.; заявл. 15.07.2013; опубл. 20.02.2015, бюл. № 5.
5. Пат. 2550955 РФ. МПК G01N33/58, G01N33/53 Способ электрохимического иммуноанализа для определения вирусов/антигенов вирусов / Козицина А.Н., Малышева Н.Н., Глазырина Ю.А., Матерн А.И., Иванова А.В.; заявл. 11.12.2013; опубл. 20.05.2015, бюл. № 14.

Материалы научных конференций:

6. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический метод определения антигена вируса кори на основе нанокompозитных частиц Fe_3O_4 в биоматериале / В.О. Ждановских, Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, А.Н. Козицина // Химия в федеральных университетах: сборник статей материалов конференции. Екатеринбург: УрФУ, 2014. С. 80 (0,1 п.л./ 0,02 п.л.).
7. Малышева, Н.Н. Синтез конъюгатов IgG-(Fe_3O_4 -SiO₂) для определения антигена вируса кори / В.О. Ждановских, Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, А.Н. Козицина // Проблемы теоретической и экспериментальной химии: тезисы докладов XXIV Российской молодежной научной конференции. Екатеринбург, 2014. С. 107 (0,12 п.л./ 0,03 п.л.).
8. Малышева, Н.Н. Определение *E.coli* с использованием электрохимического бесферментного иммуносенсора на основе магнитных нанокompозитных частиц, модифицированных производным ферроцена / Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, О.Н. Чупахин, А.И. Матерн, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Тезисы докладов Второго съезда аналитиков России. Москва, 2013. С. 84 (0,12 п.л./ 0,02 п.л.).
9. Malysheva, N.N. Electrochemical sensor for detection of pathogen microorganisms (*Salmonella thyphimurium*) using ferrocen modified magnetic nanocomposites / N.N. Malysheva, Y.A. Glazyrina, A.N. Kozitsina, A.I. Matern //

Тези ІХ Всеукраїн. конференція з аналітичної хімії. Донецьк: «Ноулідж», 2013. С. 134 (0,12 п.л./ 0,03 п.л.).

10. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический сенсор для определения *E.coli* на основе магнитных нанокompозитных частиц, модифицированных производными ферроцена / Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, О.Н. Чупахин, А.И. Матерн, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Химия и медицина: тезисы докладов ІХ Всероссийской конференции. Уфа: РИЦ БашГУ, 2013. С. 237 (0,12 п.л./ 0,02 п.л.).

11. Малышева, Н.Н. Синтез и использование для электрохимического определения *E.coli* электроактивных магнитных нанокompозитов на основе Fe_3O_4 / Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, А.Н. Козицина, А.И. Матерн, О.Н. Чупахин // Физика и химия наноразмерных систем: сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции. Екатеринбург: УрФУ, 2012. С. 103-104 (0,12 п.л./ 0,02 п.л.).

12. Glazyrina, Y.A. Electroactive nanocomposite based on Fe_3O_4 nanoparticles for electrochemical immunosensors / Malysheva N.N., E.V. Verbitsky, I.A. Uteпова, A.I. Matern, A.N. Kozitsina, G.L. Rusinov, O.N. Chupakhin., V.N. Charusin // Book of abstracts of «Nanof ormulation-2012». Spain. 2012. P. 99 (0,12 п.л./ 0,1 п.л.).

13. Малышева, Н.Н. Синтез ферроценмодифицированных магнитных нанокompозитов и использование их для электрохимического определения *E.coli* / Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, А.Н. Козицина, О.Н. Чупахин, А.И. Матерн // Материалы VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012». Уфа: БашГУ, 2012. С. 107 (0,12 п.л. / 0,02 п.л.).

14. Малышева Н.Н. Новые метки в иммуноанализе на основе модифицированных органическими соединениями наночастиц магнетита / Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, Т.С. Митрофанова, А.В. Охохонин, А.Н. Козицина, А.В. Иванова, Г.Л. Русинов, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина, Чарушин В.Н. // Разделение и концентрирование в аналитической химии и

радиохимии: материалы III Всероссийского симпозиума. Краснодар: «Офис-Альянс», 2011. С. 120 (0,12 п.л. / 0,01 п.л.).

15. Malysheva, N.N. Electrochemical sensors based on nanoparticles of metals/metall oxides for clinical diagnostics / A.N. Kozitsina, N.N. Malysheva, S.S. Dedeneva, A.V. Ivanova, G.L. Rusinov, V.N. Charushin, K.Z. Brainina // The 9th spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, Electrochemical Sensors: from nanoscale engineering to industrial application. Finland. 2011. P. 227 (0,12 п.л. / 0,02 п.л.).

16. Малышева, Н.Н. Электроактивные наноконпозиты для иммуноанализа на основе Fe₃O₄ / Н.Н. Малышева, А.И. Матерн // Достижения в химии и химической технологии: тезисы научной конференции. Екатеринбург, 2011. С. 75 (0,12 п.л. / 0,7 п.л.).

17. Малышева, Н.Н. Магнитные наноконпозиты на основе наночастиц Fe₃O₄ и электроактивных полимеров для иммуноанализа / Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, А.И. Матерн, А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, Г.Л. Русинов, В.Н. Чарушин // Аналитическая химия – новые методы и возможности: тезисы докладов конференции. Москва: МИСиС, 2010. С. 181 (0,12 п.л. / 0,02 п.л.).

18. Малышева, Н.Н. Электрохимические методы в бесферментных иммуносенсорах на основе металлоорганических комплексов, наночастиц металлов/оксидов. Токсичность наночастиц / А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, Е.Л. Поморцева, Н.Н. Малышева, Х.З. Брайнина // Теория и практика электроаналитической химии: материалы симпозиума. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. С. 6-9 (0,3 п.л. / 0,06 п.л.).

19. Малышева, Н.Н. Электроактивные наноконпозиты для иммуноанализа на основе Fe₃O₄ / Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, А.И. Матерн, А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, Г.Л. Русинов, В.Н. Чарушин // Актуальные проблемы органического синтеза и анализа. Екатеринбург: НИСО УрО РАН, 2010. С. 317-329 (1,15 п.л. / 0,2 п.л.).

Подписано в печать 15.07.2015 г. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 1,4. Тираж 110 экз. Заказ № 78.

Отпечатано: Копировальный центр «Таймер» 620075, г. Екатеринбург ул. Луначарского, 136.