

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов
 Химическая технология
 Отделение химической инженерии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Разработка электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита

УДК 616.831.9-002-097.1

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Шевелева Полина Геннадьевна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В.	К.Х.Н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент (ОСГН, ШБИП)	Маланина В.А.	К.Э.Н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Л.А.	-		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент (ОХИ, ИШПР)	Михеева Е.В.	К.Х.Н.		

Томск – 2020



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов
Химическая технология
Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП

(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ83	Шевелевой Полине Геннадьевне

Тема работы:

Разработка электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	№ 128-26/с от 07.05.2020

Срок сдачи студентом выполненной работы:	31.05.2020
--	------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	Объекты исследования: наночастицы серебра, конъюгаты на основе наночастиц серебра, экспериментальная тестовая конструкция электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита.
---------------------------------	--

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	Аналитический обзор по получению и исследованию физико-химических свойств конъюгатов на основе наночастиц серебра. Обсуждение результатов, связанных с получением наночастиц серебра и их конъюгатов инструментальными методами анализа. Возможность использования конъюгатов на основе наночастиц серебра в электрохимическом иммуноанализе.
Перечень графического материала	Графический материал полученных результатов

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы

Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент и ресурсоэффективность	Маланина В.А.
Социальная ответственность	Скачкова Л.А.
Выполненный на иностранном языке	Терре Д.А.

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:

Раздел 3. Результаты и обсуждения

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	25.09.2019
---	------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В.	к.х.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Шевелева Полина Геннадьевна		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов
 Химическая технология
 Уровень образования: магистратура
 Отделение химической инженерии
 Период выполнения: осенний / весенний семестр 2019/2020 учебного года

Форма представления работы:

Магистерская диссертация

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы**

Срок сдачи студентом выполненной работы:	31.05.2020
--	------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
22.12.2019	<i>Литературный обзор по теме</i>	20
6.02.2020	<i>Методики эксперимента</i>	30
15.03.2020	<i>Обсуждение результатов</i>	50

СОСТАВИЛ:

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В.	К.Х.Н.		

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Михеева Е.В.	К.Х.Н.		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ83	Шевелева Полина Геннадьевна

Инженерная школа	ИШПР	Отделение	ОХИ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Бюджет научного исследования составляет 1 114 481,2 руб.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды – 30.2%

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	1.1 Потенциальные потребители результатов исследования 1.2. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения 1.3. SWOT – анализ
2. Разработка устава научно-технического проекта	2.1. Устав проекта 2.2. Организационная структура проекта
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	3.1 План проекта (календарный план НТИ) 3.2 Бюджет проекта исследования (планируемые затраты на выполнения НТИ) 3.3 Организационная структура проекта (выбор организационной структуры научного проекта)
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. «Портрет» потребителя результатов НТИ
2. Сегментирование рынка
3. Оценка конкурентоспособности технических решений
4. Иерархическая структура работ проекта
5. Матрица SWOT
6. График проведения и бюджет НТИ
7. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ
8. Потенциальные риски

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	4.03.2020
--	-----------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент (ОСГН, ШБИП)	Маланина В.А.	К.Э.Н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Шевелева П.Г.		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ83	Шевелевой Полине Геннадьевне

Школа	ИШПР	Отделение (НОЦ)	ОХИ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Разработка электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p>Объектами исследования являются: НЧ серебра и конъюгаты на основе НЧ серебра.</p> <p>Прибор: Вольтамперометрический анализатор ТА – Lab</p> <p>Область применения: медицинские учреждения, фармацевтические компании, лаборатории разных профилей</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<ul style="list-style-type: none"> - Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 № 197-ФЗ. (с изменениями на 16 декабря 2019 года); - Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны исследователя; - Технический регламент таможенного союза ТР ТС 019/2011 «О безопасности средств индивидуальной защиты» (с изменениями на 28 мая 2019 года); - ГОСТ 12.0.004-2015. «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения»; - Федеральный закон "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации" от 21.11.2011 N 323-ФЗ; - Федеральный закон "Об отходах производства и потребления" от 24.06.1998 N 89-ФЗ (с изм. на 25.11.2013 года)

<p>2. Производственная безопасность: 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Отклонение показателей микроклимата в помещении; - недостаточная освещенность рабочей зоны; - превышение уровней шума; - электробезопасность; - токсические, раздражающие факторы возникающие при работе с химическими реактивами.
<p>3. Экологическая безопасность:</p>	<ul style="list-style-type: none"> - анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); - анализ воздействия объекта на литосферу (отходы).
<p>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p>	<p>Наиболее возможные ЧС:</p> <ul style="list-style-type: none"> - связанные с производственными авариями (пожары, взрывы, выброс вредных веществ в окружающую среду).

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	12.03.2020
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Лариса Александровна	—		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Шевелева Полина Геннадьевна		

18.04.01 – Химическая технология
Анализ и контроль в биотехнологических и фармацевтических производствах

Планируемые результаты освоения

Код	Результат обучения	Требования ФГОС ВО, СУОС, критериев АИОР, и/или заинтересованных сторон
Общие по направлению подготовки		
P1	Применять глубокие естественно-научные, математические и инженерные знания для создания новых материалов	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ОПК-3, ПК-1, 2, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.10), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P2	Использовать глубокие знания в области современных технологий химического производства для решения междисциплинарных инженерных задач	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК - 2, 4-7, ОПК-3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P3	Ставить и решать инновационные задачи инженерного анализа, связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-2, 14), Критерий 5 АИОР (п. 2.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, проектировать и использовать новое оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на мировом рынке	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-4, 5, 6), Критерий 5 АИОР (п. 2.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P5	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в области создания новых материалов, современных химических технологий, нанотехнологий	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-1, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.4), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P6	Внедрять, эксплуатировать современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их высокую эффективность, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-4-7), Критерий 5 АИОР (п. 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
Универсальные компетенции		
P7	Использовать <i>глубокие знания по проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной инженерной деятельности</i> с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-1, ПК-8, 13), Критерий 5 АИОР (п. 3.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P8	<i>Активно владеть иностранным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-4, ОПК-1, ОПК-5), Критерий 5 АИОР (п. 3.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве члена и руководителя группы, состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность <i>следовать корпоративной культуре</i> организации	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-3, ПК-9, ОПК-2), Критерий 5 АИОР (п. 3.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P10	Демонстрировать <i>глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-3, ПК-6, 10), Критерий 5 АИОР (п. 3.4, 3.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P11	<i>Самостоятельно учиться</i> и непрерывно <i>повышать квалификацию</i> в течение всего периода профессиональной деятельности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-6, ПК-11), Критерий 5 АИОР (3.6), согласованный с

		требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
<i>Профиль Анализ и контроль в биотехнологических и фармацевтических производствах</i>		
P12	Применять глубокие знания в области разработки современных технологий химико-фармацевтического и биотехнологического производства для решения междисциплинарных инженерных задач	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-1, ОПК-3, ПК-1, 2, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.10), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> , требования профессиональных стандартов (40.010 Специалист по техническому контролю качества продукции).

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 125 с., 50 рисунков, 21 таблиц, 58 источников, 1 приложение.

Ключевые слова: наночастицы серебра, конъюгаты, электрохимический иммуносенсор, анодная инверсионная вольтамперометрия.

Объектами исследования являются наночастицы серебра, конъюгаты на основе наночастиц серебра.

Цель работы: разработать электрохимический иммуносенсор для определения антигена вируса клещевого энцефалита с использованием конъюгатов антител, меченных наночастицами серебра.

В процессе исследования были синтезированы наночастицы серебра и их конъюгаты.

В результате исследования были охарактеризованы свойства наночастиц серебра и их конъюгатов методами вольтамперометрии, УФ-вид спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), подобраны оптимальные рабочие условия для регистрации электрохимического сигнала от наночастиц серебра и их конъюгатов методом анодной инверсионной вольтамперометрии, разработан электрохимический иммуносенсор для определения антигена вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в вакцине.

Степень внедрения: данная работа находится на стадии научного исследования, результаты работы представлены и опубликованы в сборнике XXI Международной конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI» имени профессора Л. П. Кулева.

Область применения: медицинские и диагностические учреждения

В будущем планируется разработать электрохимический иммуносенсор для определения антигена клещевого энцефалита в биологических объектах (кровь человека и животных).

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

НЧ – наночастицы

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

Ab@Ag – конъюгат НЧ серебра с антивидовыми моноклональными антителами

БСА@Ag – конъюгат НЧ серебра с БСА

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

НИР- научно исследовательская работа

ВКР – выпускная квалификационная работа

ПДУ – предельно допустимые уровни

ЧС – чрезвычайные ситуации

Содержание	
Введение.....	15
Глава 1 Литературный обзор	18
1.1 Способы получения конъюгатов и их характеристики.....	18
1.2 Нековалентная конъюгация НЧ с биомолекулами.....	19
1.3 Ковалентная конъюгация наночастиц с биомолекулами	20
1.4 Характеристика конъюгатов физико-химическими методами анализа..	23
1.4.1 Взаимодействие с хлоридом натрия	23
1.4.2 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия.....	24
1.4.3 Спектрофотометрический метод анализа.....	26
1.4.4 Просвечивающая электронная микроскопия	28
1.4.5 Регистрация электрохимического сигнала от НЧ серебра.....	30
Глава 2 Материалы и методы исследования	32
2.1 Приборы и оборудование.....	32
2.2 Реактивы	34
2.3 Объекты исследования	35
2.4 Методы исследования	35
2.4.1 Синтез наночастиц серебра и их концентрирование.....	35
2.4.2 Подбор соотношения наночастиц серебра – белок	36
2.4.3 Получение серебряных конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином (БСА)	37
2.4.4 Получение конъюгатов антивидовых моноклональных антител против ВКЭ с меткой НЧ серебра ($C_{\text{антител}}=1600$ ед/мл).....	38
2.4.5 Методика очистки конъюгатов от несвязанного белка.....	39
2.4.6 Методика записи вольтамперограмм	39
2.4.7 Методика десорбции антигена ВКЭ с алюминием гидроксида.....	40
2.4.8 Методика определения антигена вируса клещевого энцефалита в образцах.....	40
Глава 3 Результаты и обсуждения	43
3.1 Характеристика наночастиц серебра.....	44
3.2 Характеристика конъюгатов наночастиц серебра с бычьим сывороточным альбумином (БСА)	50
3.3 Сборка тест-системы и усиление сигнала серебра	55

3.3.1 Характеристика конъюгатов НЧ серебра с антивидовыми моноклональными противоклеточными антителами	55
3.3.2 Усиление сигнала серебра	57
3.3.3 Аprobация электрохимического иммуносенсора по определению рекомбинантного белка в вакцине ЭнцеВир	59
Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	62
4.1 Предпроектный анализ	62
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования.....	62
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	63
4.2 SWOT-анализ.....	64
4.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации.....	66
4.4 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования	68
4.5 Инициация проекта	68
4.6 Ограничения и допущения проекта.....	69
4.7 Планирование управления научно-техническим проектом.....	70
4.7.1 Организационная структура проекта	70
4.7.2 План проекта.....	70
4.8 Бюджет научного исследования	72
4.8.1 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ.....	73
4.8.2 Основная заработная плата исполнителей темы	75
4.8.3 Отчисления на социальные нужды	77
4.9 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	78
4.9.1 Оценка сравнительной эффективности исследования	78
Глава 5 Социальная ответственность.....	82
5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	82
5.1.1 Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства	84
5.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны	86
5.2 Производственная безопасность	87

5.2.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследования и обоснование мероприятий по их устранению	88
5.2.1.1 Работа с вредными химическими веществами	88
5.2.1.2 Отклонение показателей микроклимата	89
5.2.1.3 Превышение уровня шума	91
5.2.1.4 Освещенность рабочей зоны.....	91
5.2.1.5 Электробезопасность	92
5.3 Экологическая безопасность	94
5.3.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду	94
5.3.2 Мероприятия по защите окружающей среды	94
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	95
5.4.1 Анализ вероятных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований	95
5.4.2 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС.....	95
Заключение	99
Список публикаций	100
Список используемых источников.....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	108

Введение

Научно исследовательская работа (НИР) связана получением и исследованием конъюгатов на основе наночастиц (НЧ) серебра, которые в дальнейшем были использованы при разработке электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Распространенным сезонным инфекционным заболеванием в нашей стране, особенно в Сибирском регионе, является клещевой энцефалит, который вызывается вирусом из рода *Flavivirus* и обычно вызывает лихорадку и поражение ЦНС (центральной нервной системы), а в некоторых случаях приводит к летальным исходам. В связи с этим ВКЭ требует постоянного внимания к его профилактике, лечению и ранней диагностики.

Среди самых распространённых методов определения ВКЭ и коммерчески доступных является метод ИФА формата «сэндвич». В качестве твердой фазы используют полистироловые планшеты для титрования, а в качестве маркера используют фермент - пероксидаза хрена или золи металлов и красителей (наиболее часто коллоидное золото).

Использование ферментного маркера пероксидазы хрена имеет ряд недостатков: относительно сложная процедура выделения и очистки функционально активного фермента и обусловленная этим значительная стоимость полученного маркера; необходимость в хранении фермента при низких температурах или в консерванте и периодической оценке его активности; потеря активности фермента и иммуноглобулинов в процессе получения конъюгата путем ковалентного связывания этих реагентов.

Введение маркера на основе золь серебра имеют перед ферментными маркерами ряд преимуществ такие, как получение НЧ серебра предельно просто; связывание НЧ серебра с иммуноглобулинами производится щадящим сорбционным способом с минимальными потерями биологического материала, полученные конъюгаты с НЧ серебра стабильны в относительно широком

диапазоне физико-химических условий, НЧ серебра в качестве маркера более дешевы, чем ферменты.

Таким образом, работа направлена на получение и исследование физико-химических свойств конъюгата противоклещевых иммуноглобулинов с НЧ серебра, где серебро является электрохимической меткой. Использование метода вольтамперометрии для регистрации сигнала от НЧ серебра позволит в будущем удешевить тест-систему определения ВКЭ, повысить чувствительность и сократить время анализа.

Объектами исследования в данной работе являются НЧ серебра и их конъюгаты на основе антивидовых моноклональных антител против ВКЭ.

Цель исследования: разработать электрохимический иммуносенсор для определения антигена ВКЭ с использованием конъюгатов антивидовых моноклональных антител, меченных НЧ серебра (Ab@Ag).

Задачи исследования:

1. Синтезировать НЧ серебра; охарактеризовать их инструментальными методами анализа (ПЭМ, УФ-вид спектроскопия, вольтамперометрия);
2. Получить конъюгаты антивидовых моноклональных антител против ВКЭ с меткой НЧ серебра (Ab@Ag) ;
3. Исследовать физико-химические свойства конъюгатов Ab@Ag инструментальными методами анализа (ПЭМ, УФ-вид спектроскопия, вольтамперометрия);
4. Подобрать рабочие вольтамперометрические условия регистрации аналитического сигнала от НЧ серебра конъюгатов Ab@Ag;
5. Разработать электрохимический иммуносенсор для определения антигена ВКЭ с использованием конъюгатов Ab@Ag;
6. Апробировать электрохимический иммуносенсор для качественного определения антигена ВКЭ в вакцине ЭнцеВир.

Научная значимость и новизна результатов

Впервые был подобран эффективный растворитель, который бы позволил растворить конъюгат с антителами, высвобождая из него ионное серебро. Был собран и апробирован модельный электрохимический иммуносенсор для определения антигена ВКЭ.

Реализация и апробация работы

Результаты работы представлены и опубликованы в сборнике XXI Международной конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI» имени профессора Л. П. Кулева.

Глава 1 Литературный обзор

1.1 Способы получения конъюгатов и их характеристики

Конъюгаты металлическая наночастица-антитело часто используются в качестве оптических или электрохимических маркеров в таких областях, как иммуногистохимия, биосенсоры и иммунологические анализы [1]. В качестве агента обнаружения для электрохимических сенсоров особое внимание привлекли наночастицы серебра, так как они проявляют лучшие электрохимические свойства и высокую связывающую способность с молекулами белка [2]. Чтобы выполнять эту роль, антитело должно быть иммобилизовано на поверхности наночастицы. Образование конъюгата может происходить по двум механизмам взаимодействия: ковалентное и нековалентное (рис. 1.1).

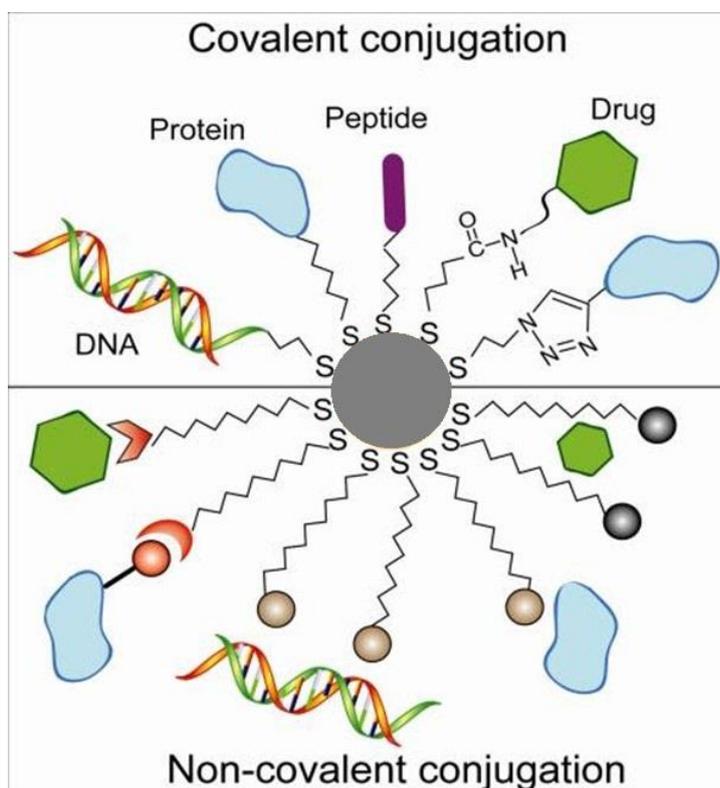


Рисунок 1.1 – Стратегии конъюгации НЧ через ковалентное и нековалентное сопряжение [3].

1.2 Нековалентная конъюгация наночастиц с биомолекулами

Наиболее простым способом взаимодействия антител с НЧ является нековалентная (адсорбционная) конъюгация, которая обусловлена электростатическими и гидрофобными взаимодействиями (рис. 1.2) [4].

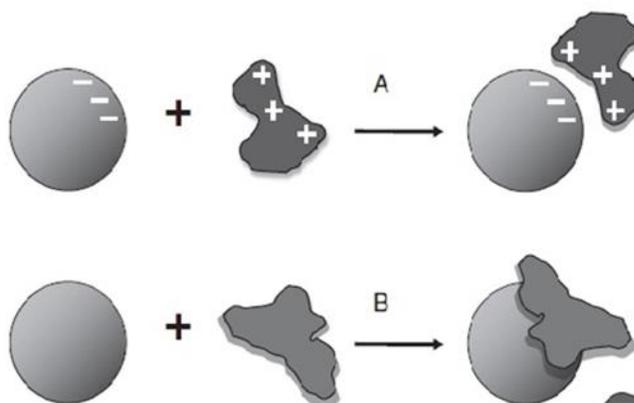


Рисунок 1.2 – Нековалентная конъюгация. А – Электростатические взаимодействия; В – Гидрофобные взаимодействия

Нековалентное связывание чаще всего используется для получения различных биоконплексов из-за их обратимого характера и простоты высвобождения. Адсорбция белка на гидрофобных частицах происходит посредством сильных взаимодействий неполярных или ароматических аминокислотных остатков с поверхностными полимерными цепями на частицах с одновременным исключением молекул воды. Поскольку белки обычно содержат гидрофобные структуры ядра с преимущественно гидрофильными поверхностями, их взаимодействие с гидрофобными частицами должно включать значительные конформационные изменения для создания крупномасштабных гидрофобных контактов [5]. Пассивная адсорбция интенсивно изучалась в связи с тем, что она связана с иммобилизацией молекул антител на полистироловых микропланшетах, например, Butler et al. (1992) исследовал физическое и функциональное поведение захватывающих антител, адсорбированных на полистироле [6], он же (2000a), дал краткое описание

эффектов адсорбции различных белков на гидрофобных поверхностях [7]. В исследованиях Cantarero et al. (1980) обсуждаются адсорбционные характеристики белков для полистирольных поверхностей [8], и Butler et al. (1997) сравнивает влияние пассивной адсорбции на антигенную специфичность молекул иммобилизованных антител [9].

На основании данных исследований и многих других был сделан вывод, что адсорбция белка на частицах гидрофобного полимера должна проводиться в изоэлектрической точке конкретного белка или вблизи нее, чтобы обеспечить прилипание биомолекул к поверхности частиц с наивысшей плотностью. Белки в их изоэлектрической точке существуют в максимально сжатой конформации, поскольку эффекты отталкивания зарядов не играют существенной роли в общей глобулярной структуре. При адсорбции в изоэлектрических условиях каждый белок затем может связываться с поверхностью полимера с максимальной плотностью. Поэтому большинство предлагаемых буферных растворов, используемых для пассивной адсорбции, рекомендуют условия pH где-то в диапазоне pI белка [10].

1.3 Ковалентная конъюгация наночастиц с биомолекулами

Для создания более прочного конъюгата, например, предназначенного для длительной визуализации биологических процессов, необходимо ковалентно связать белок с модифицированной поверхностью наночастицы, так как адсорбционное связывание не является самым сильным взаимодействием и может быть трансформировано путем изменения условий среды [11].

Реагенты с амино- или карбоксильными группами носителя можно связать с помощью глутарового альдегида, либо методом активированных эфиров [12].

Конъюгация глутаральдегида с частицами амина может протекать двумя путями (рис. 1.3).

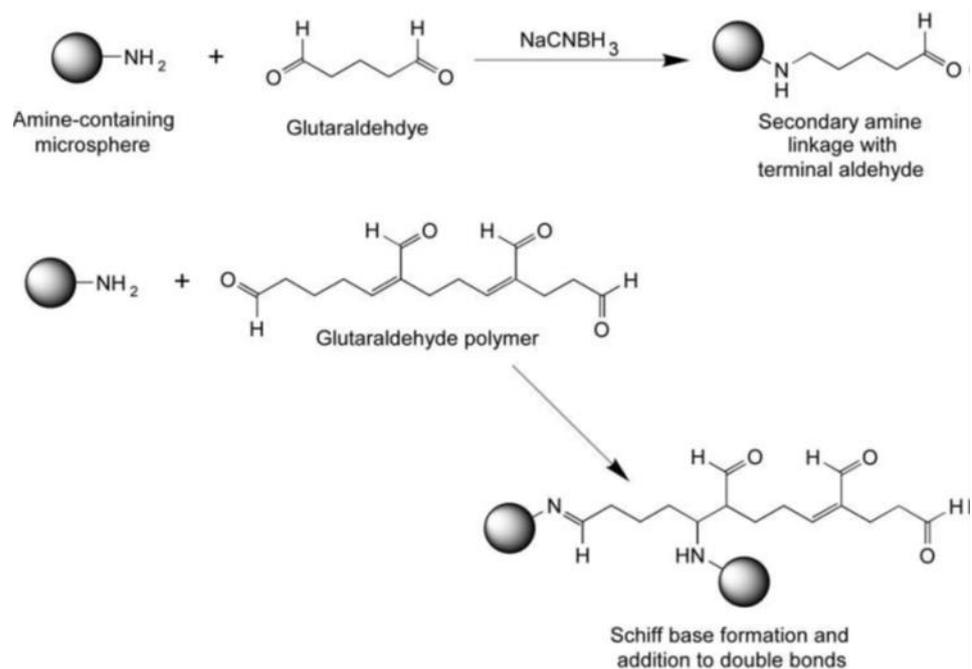


Рисунок 1.3 - Конъюгация глутаральдегида с частицами амина. 1 – Реакция альдегидных групп с аминами с использованием цианоборогидрида натрия; 2 – Реакция глутаральдегидных полимеров с частицами амина путем добавления к двойным связям.

При реакции альдегидных групп с аминами с использованием цианоборогидрида натрия приводит к вторичным (или третичным) аминным связям с модификациями, содержащими концевой альдегид для дальнейшего связывания с лигандами. Альтернативно, глутаральдегидные полимеры могут реагировать с частицами амина путем добавления к двойным связям, что приводит к полимерному покрытию, которое содержит как альдегиды, так и дополнительные двойные связи для дальнейшего связывания с аминсодержащими молекулами [13].

Другой метод на основе сшивающего агента, который был использован для связывания белков с частицами амина, включает использование N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионата (SPDP). Этот реагент содержит амин-реактивный сложный эфир NHS и тиол-реакционноспособную пиридилдисульфидную группу [14]. Аминсодержащие частицы могут быть активированы реакцией с SPDP с образованием тиолреакционноспособных

производных. Тиолсодержащие белки, такие как частично восстановленные дисульфидные антитела, могут быть связаны с активированными частицами в двухстадийной реакции [15]. Illum and Jones (1985) описал альтернативный метод, связывания модифицированных SPDP частиц с антителами, которые также были модифицированы с помощью SPDP, а затем группа пиридилдисульфида восстановлена с образованием тиолов [16]. Смешивание тиолированного антитела с SPDP-активированными частицами приводит к ковалентной конъюгации через дисульфидные связи (рис. 1.4).

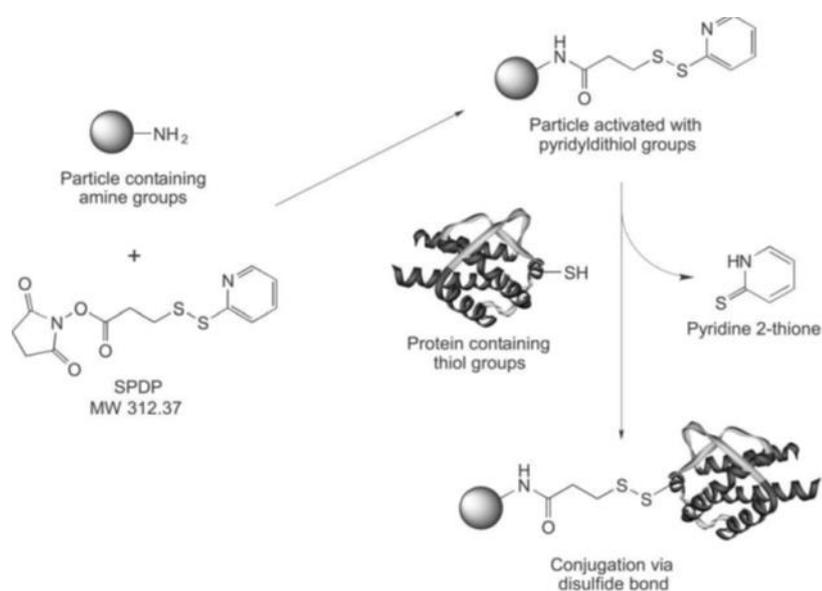


Рисунок 1.4 – Конъюгация частиц методом активированных эфиров

В данном разделе были представлены наиболее часто используемые сшивающие агенты частиц с белками. Один из более эффективных белковых сшивающих агентов является глутаровый альдегид в связи с тем, что он имеет низкую стоимость и высокую реакционную способность. Но в отличие от глутаральдегида в методе активированных эфиров не нужно использовать сшивающий агент в большом избытке для предотвращения агрегации. Это связано с тем, что только один из концов сшивающего агента может реагировать с аминами на частицах.

1.4 Характеристика конъюгатов физико-химическими методами анализа

Как только белок был прикреплен к наночастице, полученный конъюгат можно использовать в качестве аналитического инструмента. Но перед этим важно убедиться, что антитело было успешно адсорбировано и сохраняет свою активность. Конъюгаты, как и НЧ серебра можно охарактеризовать несколькими методами, например, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, пропускающая электронная микроскопия (ПЭМ), спектрометрия и реакция с NaCl [17]. Эти методы могут охарактеризовать такие параметры, как морфологию, размер и кристалличность, а также подтвердить образование образца, показывая их поглощение при определенной длине волны. Такие характеристики очень важны для наноструктурированных биоинтерфейсов, которые могут предоставлять спектральную, массовую и пространственную информацию [18].

1.4.1 Взаимодействие с хлоридом натрия

Важной характеристикой НЧ серебра является его агрегативная устойчивость в процессе хранения и при проведении анализов. Для получения стабильного конъюгата часто применяется добавление минимума количество белка, необходимое для предотвращения агрегации, вызванной NaCl в десятикратном избытке [5]. Для этого нужно провести тест на агрегативную устойчивость наночастиц серебра раствором хлорида натрия разных концентраций и определить минимальную концентрацию хлорида натрия, при которой начинается быстрая заметная коагуляция наночастиц [19].

В первую очередь необходимо выяснить, какой концентрации нужно добавлять соль к наночастицам с антителами. Поэтому раствор хлорида натрия разных концентраций (от 0,05 до 7%) добавляли к наночастицам серебра. Из рисунка 1.5А можно увидеть изменение цвета при концентрации 0,5% (D), но

полное разрушение коллоида происходит при концентрации 1% (E). Для дальнейших экспериментов брали за основу концентрацию электролита 1% плюс его деситикратный избыток.

Далее в серию суспензий наночастиц серебра с повышением концентрации антител (от 100 до 0,5 ед/мл) добавляли агрегирующий агент – NaCl 10%. При концентрации антител 1 ед/мл (G) произошло изменение цвета (рис. 1.5B). По представленным результатам можно сделать вывод, что антитела к вирусу КЭ частично стабилизируют наночастицы серебра в промежутке концентраций от 40 ед/мл до 1 ед/мл. После полученных данных можно рассчитать оптимальное соотношение антител в растворе биоконъюгата [20].

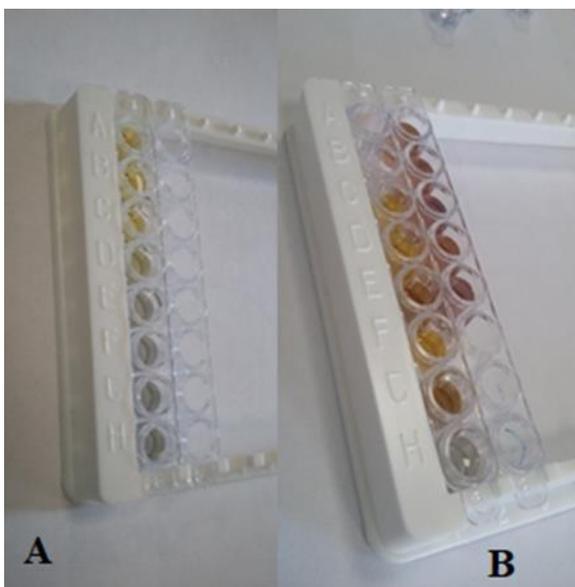


Рисунок 1.5 – Тест на агрегативную устойчивость. А – НЧ серебра + NaCl; В – НЧ серебра + антитела + NaCl.

1.4.2 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) основан на регистрации характеристического флуоресцентного излучения атомов, который возникает при облучении образца потоком излучения рентгеновской трубки. По пикам полученного спектра можно качественно определить, какие элементы

присутствуют в образце. Для идентификации элемента руководствуются положением его линии в спектре. Кроме того, по одному из вариантов метода можно определить фазовую и кристаллическую структуру частиц.

В качестве примера можно привести статью «Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*» [21], где показан дисперсионный рентгеновский анализ энергии (EDX) НЧ серебра. На рисунке 1.6 можно увидеть сильный сигнал в области серебра, что подтверждает образование наночастиц. Известно, что нанокристаллы металлического серебра обычно показывают типичный оптический пик поглощения примерно при 3 кэВ из-за поверхностного плазмонного резонанса [22]. Другие элементарные сигналы регистрируются, возможно, из-за элементов из ферментов или белков, присутствующих в латексе *J. curcas*.

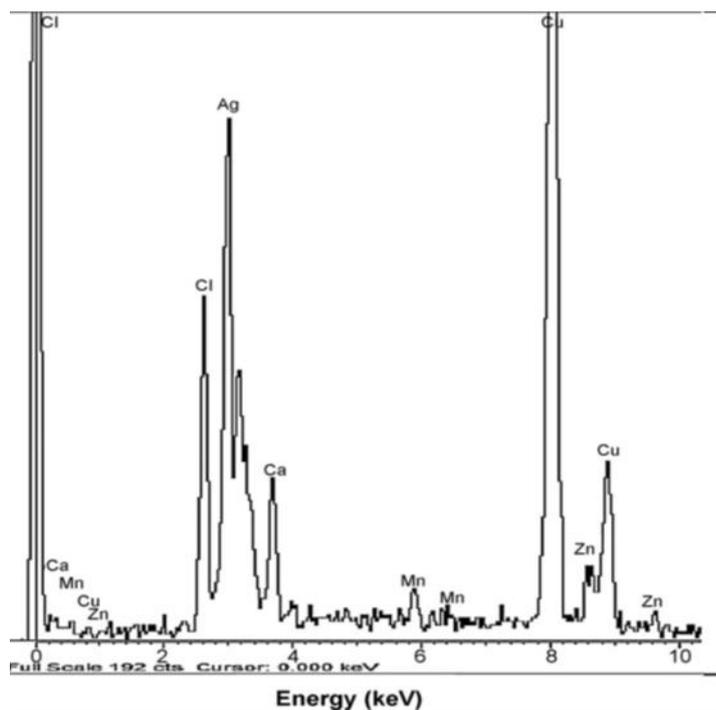


Рисунок 1.6 – Спектр EDX для НЧ серебра.

Фазовую и кристаллическую структуру НЧ серебра можно подтвердить с помощью рентгенодифракционного анализа (XRD). На рисунке 1.7 можно увидеть пять дифракционных пиков в диапазоне 2θ 20 – 80 °, что соответствует плоскостям решетки (111), (200), (220), (311), (222) гранецентрированной

кубической (ГЦК) структуры металлического серебра [23]. Кроме того, на кристаллограммах не наблюдается никаких примесных пиков. По результатам рентгенодифракционного анализа можно сделать вывод, что полученные НЧ серебра представляют собой чистое кристаллическое серебро.

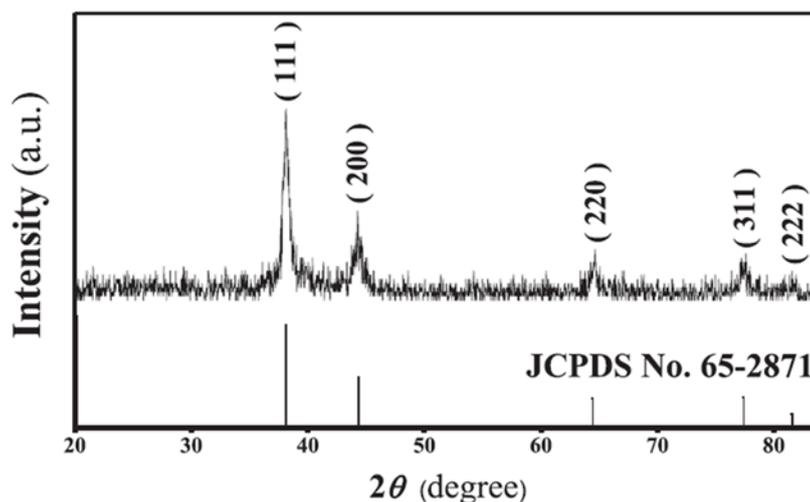


Рисунок 1.7 – Рентгенограмма НЧ серебра.

1.4.3 Спектрофотометрический метод анализа

УФ-видимая абсорбционная спектроскопия является наиболее широко используемым методом для характеристики оптических свойств НЧ серебра, поскольку интенсивность и положение поверхностной плазмонной полосы коллоидного серебра связаны с их размером, формой и дисперсностью [24].

Отмечено, что форма и расположение плазмонной полосы в спектрах УФ-вид могут различаться в зависимости от размера и полидисперсности образующихся наночастиц [25]. Также НЧ серебра имеет характерную полосу поглощения благодаря поверхностному плазмонному резонансу, который возникает в результате когерентного колебания свободных электронов металлической частицы в резонансе со световой волной [23].

В качестве примера на рисунке 1.8 приведены спектры поглощения смеси нитрат серебра-избыток боргидрида натрия (а), эквимольное количество смеси

нитрат серебра-боргидрид натрия с БСА (b) и эквимольное количество смеси нитрат серебра-боргидрид натрия (c).

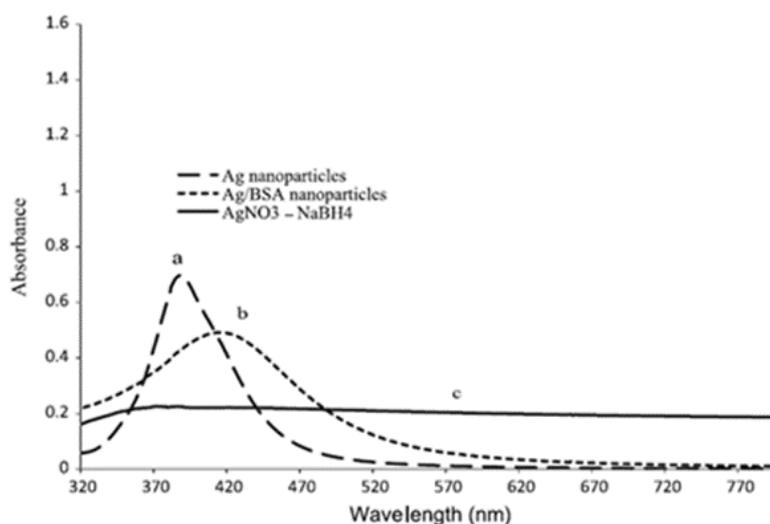


Рисунок 1.8 – Спектры поглощения (a) нитрата серебра-избытка боргидрида натрия, (b) эквимольного количества смеси нитрата серебра-боргидрида натрия вместе с БСА и (c) эквимольного количества смеси нитрата серебра-боргидрида натрия.

Для смеси нитрата серебра и избытка боргидрида натрия в спектрах поглощения в видимой области можно увидеть интенсивный пик при 390 нм, который характерен для поверхностного плазмонного пика наночастиц серебра. При взаимодействии эквимольных количеств нитрата серебра и боргидрида натрия не наблюдается пика поглощения, что свидетельствует об отсутствии образования наночастиц. Очевидно, что в отсутствие избытка боргидрида синтезированные наночастицы серебра не стабилизируются.

Однако, когда БСА используется вместе с эквимольным количеством смеси нитрат серебра-боргидрид натрия, поверхностный плазмонный пик сдвинут от 390нм до 414нм А, что говорит о взаимодействии наночастиц серебра с БСА. Также известно, что БСА выступает в качестве стабилизатора наночастиц [26].

Таким образом спектрофотометрическим методом анализа можно охарактеризовать оптические свойства НЧ серебра и определить происходит ли образование их биоконъюгатов.

1.4.4 Просвечивающая электронная микроскопия

Хорошо известно, что метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) является наиболее наглядным и эффективным для точного определения формы и размера наночастиц и их биоконъюгатов. Метод ПЭМ основан на упругом рассеянии пучка электронов при взаимодействии с исследуемым объектом. Прошедший через образец и провзаимодействовавший с ним поток рассеянных электронов проецируется при помощи системы магнитных линз на флуоресцентном экране, фотоплёнке или сенсорном приборе с зарядовой связью. Для проведения исследования необходимо подготовить образец с наночастицами следующим образом: несколько капель коллоида или биоконъюгата наносятся на углеродную подложку, помещенную на специальную электронно-микроскопическую сеточку, далее образец высушивают и исследуют [27].

В качестве примера приведено изображение НЧ серебра и их биоконъюгатов (рис. 1.9). Из рисунка можно увидеть, что размеры коллоида и меченных антителами НЧ серебра немного отличаются в размерах за счет того, что биомолекулы расположены на поверхности коллоида.

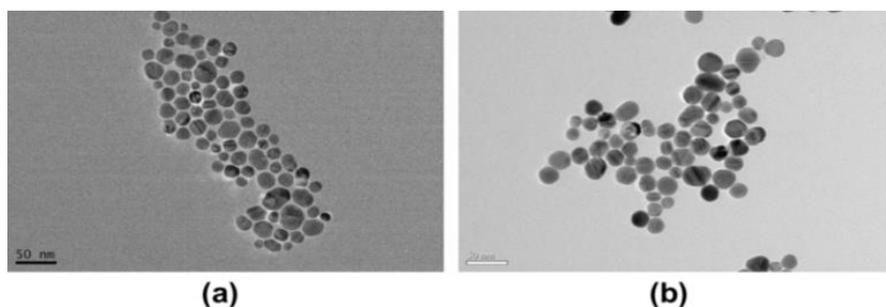


Рисунок 1.9 – ПЭМ изображения наночастиц серебра (a) и меченных антителом наночастиц серебра (b).

Также в работе Teodora Miclaș, (2016) исследуется образование белковых корон вокруг НЧ серебра [28]. С помощью ПЭМ их можно наглядно увидеть на рисунке 1.10. На нем изображены нанокубы серебра через 7 дней в 1% сыворотке, причем на них можно увидеть, как НЧ образуют дисперсный слой вокруг серебряного ядра.

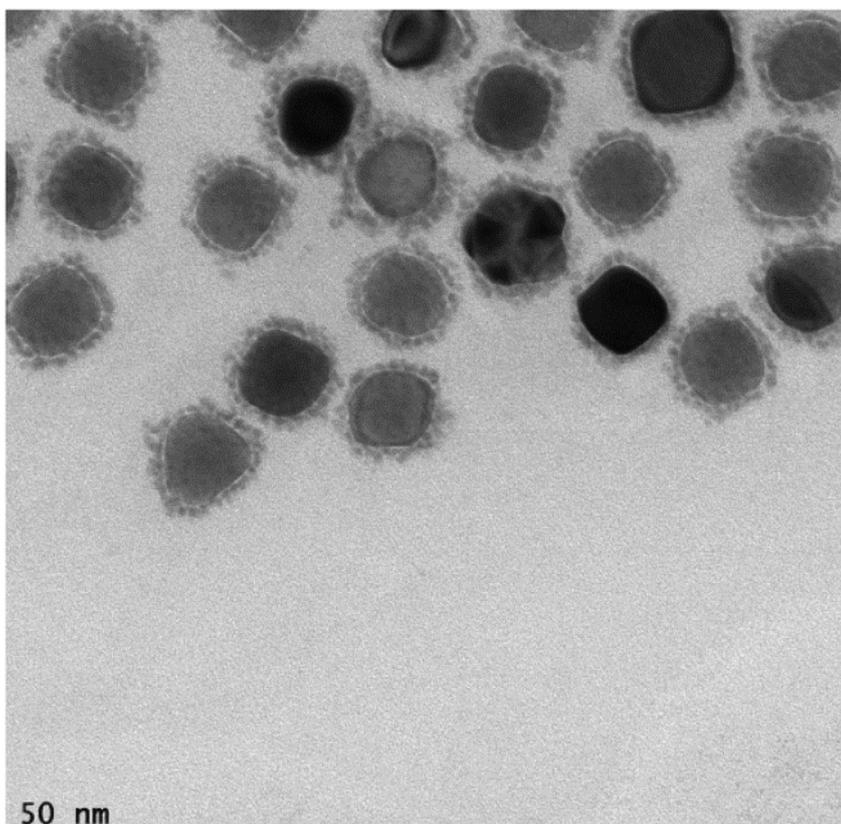


Рисунок 1.10 – ПЭМ-изображение нано- Ag_2S .

Таким образом можно сделать вывод, что на разных этапах получения НЧ серебра и их биконъюгатов необходимо использовать выше приведенные методы анализа. Для того, чтобы выяснить образовались НЧ серебра или биоконъюгаты, охарактеризовать их размер, форму, оптические свойства, кристалличность, а также подтвердить образование образца.

1.4.5 Регистрация электрохимического сигнала от НЧ серебра

За последние несколько лет электрохимические биосенсоры привлекли значительное внимание благодаря своей способности преобразовывать активность фермента в желательные электрические сигналы [29]. Биосенсоры, приборы, состоящие из биологически активных веществ и физических преобразователей, которые обладают такими преимуществами как, специфичность, низкая стоимость, простота использования и портативность [30].

Электроактивные метки, такие как металлические наночастицы, в частности золото и серебро, используются в конструкции иммуносенсоров для определения различных вирусных заболеваний [31]. Обычно, конъюгированные с антителами, металлические наночастицы генерируют сигналы благодаря своим окислительно-восстановительным свойствам в определенных условиях [32]. Для металлических частиц было опубликовано много работ по применению наночастиц золота в биосенсорах [33-35]. Наночастицы серебра менее популярны, чем наночастицы золота, в области биосенсоров из-за их ограниченной стабильности. Фактически, НЧ серебра имеют свои преимущества, такие как легкое растворение серебра без ядовитого реагента, такого как Br_2 , а также лучшие электрохимические свойства [27].

Шиманский и соавт. сообщили о первом иммуноанализе с использованием наночастиц серебра для обнаружения белка в 2010 году, в котором коллоидные агрегаты серебра переносили из 96-луночного планшета в электрохимическую ячейку и подвергали электрохимическому анализу с пределом обнаружения 3 нг / мл [36].

Также известно, что НЧ серебра имеют желательные составы в качестве меток в анализах электрохимического обнаружения по следующим причинам. Частицы серебра проявляют лучшую электрохимическую активность, чем частицы золота, электрохимическая окислительно-восстановительная реакция серебра проводится при низком потенциале 0,2 В, и они дают четкий острый вольтамперометрический пик. Кроме того, пик окисления коллоида серебра

примерно в 100 раз больше, чем у коллоида золота того же размера и концентрации [37]. НЧ серебра могут быть легко окислены до ионного серебра концентрированной азотной кислотой, тогда как для полного растворения золотой метки требуются более жесткие условия (1 М HBr, содержащий 0,1 мМ Br₂), в связи с такими условиями растворения золотого коллоида, электрод может быть поврежден [38].

Поэтому в нашей работе были выбраны НЧ серебра среди других коллоидных меток из-за их относительно простой подготовки и четкого вольтамперометрического сигнала.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Приборы и оборудование

Оборудование:

1) Весы аналитические Acculab ALC.

Аналитические весы серии ALC - надежные лабораторные весы производства одного из лидеров на рынке медицинского и лабораторного оборудования - компании Acculab. Особенности весов: поддержка 20 единиц измерения веса, высокая скорость отклика, режимы процентного и рецептурного взвешиваний, подсчета деталей, взвешивания нестабильных образцов, интуитивно понятный интерфейс с функциями индикации перегрузки/недовеса, разряда батареи и простой калибровкой, передача полученных данных на ПК/принтер.

2) Анализатор (TA-Lab).

Автоматизированный прибор для измерения содержания токсичных микроэлементов (As, Cd, Pb, Cu, Zn, Mn, Hg, Se, I, Ni, Co, Fe, Ag, Sb, Bi, Fe, Sn) в воде, почве, пищевой продукции вольтамперометрическими методами с чувствительностью на уровне 1/10 допустимого уровня (ПДК) и ниже. Анализатор TA-Lab ориентирован на удобство проведения измерений в рутинном анализе с применением малого количества реактивов. Анализатор TA-Lab является современной версией анализаторов вольтамперометрических типа ТА, производимых НПП "Томьаналит".

3) Просвечивающий электронный микроскоп Philips CM12 (FEI Electron Optics, Эйндховен, Нидерланды).

Предназначен для исследований методом электронной сканирующей микроскопии. Предоставлен ТГУ, Томск, Россия. Расчеты среднего размера НЧ серебра и их биоконъюгатов были выполнены с помощью научного анализа изображений ПЭМ с использованием программного обеспечения Fiji (www.fiji.sc) и Origin Pro 8.0 (OriginLab, США).

4) Высокоскоростная центрифуга Allegra 64R.

Настольная высокоскоростная центрифуга Allegra 64R, производства Beckman Coulter с бесщеточным индукционным двигателем, которая хорошо подходит для высокоскоростного разделения, фракционирования субклеточных компонентов, выделения и очистки белков и вирусов. На дисплее панели управления отображается текущая скорость или ускорение, время центрифугирования, температура и режим ускорения/торможения. Скорость вращения устанавливается с шагом 100 об/мин и поддерживается с точностью ± 50 об/мин. Возможность использования адаптеров позволяет работать с пробирками различного объема. Сертифицированный на биобезопасность бакетный ротор TS-5.1-500 позволяет предотвратить образование аэрозолей в случае повреждения пробирок.

5) Высокоскоростной шейкер и термшейкер BioShake.

Интегрированная 3-мерная технология контроля встряхивания и антивибрационная технология позволяют выполнять высокоточное и эффективное встряхивание даже на самых маленьких столах. Таким образом, исчезает необходимость в забирающем время центрифугировании после смешивания. Раздражающая вибрация и шум канули в прошлое. Скоростное и деликатное смешивание по траектории в 2 мм со скоростью до 3,000 об/мин позволяет получать оптимальные результаты даже для наиболее чувствительных образцов и жидкостей.

6) Многофункциональная центрифуга с охлаждением Eppendorf.

Настольная многофункциональная центрифуга Eppendorf с охлаждением – современная, компактная, с низким уровнем шума, легко управляемая, разработанная для широкого круга лабораторных исследований.

7) Высокоскоростная мини-центрифуга.

Персональная мини-центрифуга представляет собой компактную настольную центрифугу, разработанную для медико-биологических лабораторий. Также используется при выделении РНК/ДНК, осаждении

биологических компонентов в биохимических, и химических анализах микробов веществ. Дисплей показывает одновременно три ряда значений:

Время центрифугирования;

Установленные и текущие значения скорости;

Температуру.

В работе использовалась мерная лабораторная посуда: флаконы (пеницилинки) вместимостью 10 мл, колбы конические с цилиндрической горловиной объемом 250.0 см³; колбы мерные с пришлифованной стеклянной крышкой вместимостью 500.0 мл; цилиндр мерный стеклянный объемом 20.0 мл; стакан мерный с носиком вместимостью 500.0 мл и 50.0 мл; erendorff вместимостью 2.0 мл; автоматические дозаторы.

2.2 Реактивы

Деионизированная и дистиллированная вода;

Азотнокислое серебро (AgNO₃), ГОСТ 1277-75 Россия;

Борогидрид натрия (NaBH₄), CAS 16940-66-2, Sigma-Aldrich;

Азотная кислота (HNO₃), ГОСТ 4461-77, Россия;

Калия хлорид (KCl), ГОСТ 4568-95, Россия;

Натрия гидроксид (NaOH), ГОСТ 2263-79, Россия;

Нитрат калия (KNO₃), ГОСТ 4217-77, Россия;

Трет-бутилгидропероксид 70%, ГОСТ Р 54509-2011, Россия;

Перекись водорода р-р для местного и наружного прим. 3% фл. 100 мл;

Уксусная кислота ГОСТ 61-75, Россия;

Бычий сывороточный альбумин (БСА) производитель SigmaAldrich;

ВектоВКЭ-антиген № РЗН 2017/5343. Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита. АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск;

ВектоВКЭ-IgG № РЗН 2017/5605. Набор реагентов для иммуноферментного выявления и количественного определения

иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск;

Вакцина «ЭнцеВир» суспензия для в/м введения; ампулы 0.5 мл; №000763/01, 14.04.2004 производитель от Микроген НПО ФГУП (НПО «Вирион», г. Томск) (Россия).

2.3 Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовались наночастицы серебра и их конъюгаты с БСА и антивидовыми моноклональными антителами IgG.

2.4 Методы исследования

2.4.1 Синтез наночастиц серебра и их концентрирование

Для получения стабильных НЧ серебра был применен метод, описанный в работе [39]. В эксперименте используются свежеприготовленные растворы нитрата серебра, AgNO_3 ($V_{\text{AgNO}_3}=5$ мл, $C_{\text{AgNO}_3}=0,01$ М), натрия борогидрид, NaBH_4 ($V_{\text{NaBH}_4}= 15$ мл, $C_{\text{NaBH}_4}= 0,002$ М) и деионизированная вода.

Последовательность эксперимента:

1) В колбу объемом 250мл с помощью мерного цилиндра наливали 15 мл, 0,0020 М раствор NaBH_4 . Далее ее помещали в ледяную баню и давали остыть в течении 20 минут.

2) На дно колбы помещали магнитную мешалку и начинали перемешивание.

3) Затем в колбу по каплям вводили 5 мл раствора AgNO_3 ($C=0,0010$ М). Время добавления всего раствора занимает около 3х минут.

4) После того, как весь раствор азотнокислого серебра был добавлен в колбу, перемешивание останавливали и извлекали магнитную мешалку. Окраска

раствора должна быть бледно-желтого цвета, если раствор становится коричневатым, то синтез нужно проводить заново.

После того, как были получены НЧ серебра необходимо провести их концентрирование методом центрифугирования. Для этого в каждый эпендорф вносили по 1 мл НЧ серебра, который, в свою очередь, помещали в центрифугу на 30 минут при температуре 4°C и 2600 об/мин. По истечении 30ти минут на дне эпендорфов образовывался черный осадок НЧ серебра, поэтому из эпендорфа убирали надосадок в объеме 950 мкл и помещали его в пеницилинку. Для дальнейших исследований его не использовали. Оставшийся осадок убирали с каждого эпендорфа, помещали в один. Разбивали осадок на шейкере, а потом на ультразвуковой ванне в течение 20ти минут.

2.4.2 Подбор соотношения наночастиц серебра – белок

Для того, чтобы получился стабильный конъюгат необходимо подобрать оптимальное соотношение коллоид-белок [5]. Для этого применяли метод титрования и использовали полистироловые микропланшеты и антивидовые моноклональные антитела против ВКЭ (C=1600 ед/мл) из набора реагентов ВектоВКЭ-IgG (рис. 2.1), 1%-ный раствор БСА, НЧ серебра, 10%-ный хлорид натрия и деионизированную воду.

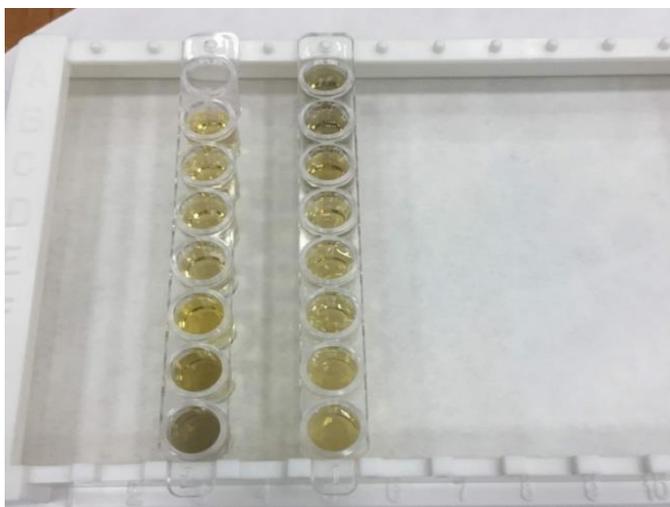


Рисунок 2.1 –Титрование НЧ серебра растворов антител (1600 ед/мл)

Порядок проведения анализа:

- 1) В лунки с В₁-Н₁ и А₅-Н₅ внести по 40 мкл воды;
- 2) В лунку А₁ внести 80 мкл раствора БСА 1% / 80 мкл антител;
- 3) Далее из лунки А₁ перенести 40 мкл БСА / 40 мкл антител в лунку В₁ и последовательно разбавить раствор БСА / антител до лунки Н₅;
- 4) После того, как раствор БСА / антител был разбавлен во всех лунках, необходимо добавить по 100 мкл НЧ серебра в каждую лунку кроме А₁;
- 5) Оставить растворы на 10 минут при комнатной температуре и поверхности закрыть пленкой;
- 6) После того, как растворы постояли 10 минут, в каждую лунку вносили 100 мкл NaCl 10% кроме лунки А₁;
- 7) После добавления хлорида натрия 10% сразу можно наблюдать изменение цвета. В лунке, где недостаточно белка цвет становится серым. Далее необходимо произвести расчеты на обычные объемы. Для этого выбирали лунку, в которой цвет не изменился, но после нее была лунка с серым цветом раствора.

2.4.3 Получение серебряных конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином (БСА)

После того, как было рассчитано оптимальное соотношение белок-коллоид и был произведен пересчет на обычные объемы, можно получить стабильный биоконъюгат.

Последовательность эксперимента:

- 1) 44 мкл БСА 1% смешивали с 1364 мкл воды в пеницилинке;
- 2) Далее в пеницилинку была добавлена половина золя серебра, т.е. 1,6 мл;
- 3) После того, как был добавлен коллоид, раствор необходимо поставить инкубировать на термостат-шейкер в течение 30 минут, 250 об/мин, при температуре 37°C;

4) По истечении 30 минут в раствор вносили вторую половину золя серебра (1,6 мл) и повторяли п. 3;

5) Далее раствор оставляли на ночь в холодильнике при температуре 4°C. На следующий день с полученным биоконъюгатом можно проводить эксперименты.

2.4.4 Получение конъюгатов антивидовых моноклональных антител против ВКЭ с меткой НЧ серебра ($C_{\text{антител}}=1600$ ед/мл)

Перед тем, как получить конъюгаты с антителами, в первую очередь, проводили диализ антител против деионизированной воды в течение суток при температуре +4°C. После проведения диализа необходимо определить оптимальное соотношение белок-коллоид (п. 2.4.2). По полученным результатам были получены следующие объемы растворов: антитела – 149,5 мкл; вода – 1040,5 мкл; НЧ серебра – 2700 мкл.

Порядок проведения анализа по получению биоконъюгатов:

1) В пробирку для центрифугирования поместили 149,5 мкл антител против ВКЭ;

2) К ним была добавлена 1/3 часть золя серебра (900 мкл);

3) Растворы смешали в пробирке и поставили инкубироваться на термошейкер в течение 30 минут при комнатной температуре и 250 об/мин;

4) По истечении 30 минут в раствор была добавлена еще 1/3 часть коллоида серебра и повторили п.3;

5) После того, как прошло еще 30 минут, в пробирку добавили последнюю часть НЧ серебра и повторили п.3;

6) Далее в пробирку внесли 346,5 мкл воды и оставили на ночь в холодильнике при температуре 4°C;

7) На следующий день необходимо произвести очистку биоконъюгата от несвязанного белка.

2.4.5 Методика очистки конъюгатов от несвязанного белка

В пробирку с раствором коллоида серебра – антител необходимо наложить 3 мл 50%-ной подушки глицерина. Слой неагрегированного конъюгата коллоидного серебра – антитело уйдет на верхнюю часть пробирки после центрифугирования при следующих условиях: 25000 об/мин в течение 30 минут, при температуре 4°C [40]. После центрифугирования медленно удаляли супернатант из пробирки центрифуги, используя автоматический дозатор. Нужно удалить как можно больше супернатанта, не связанного с белком, и соблюдать осторожность, чтобы не повредить 50%-ную глицериновую подушку, содержащую биоконъюгат. Далее нужно собрать белок, конъюгированный с коллоидом серебра и поместить во флакон. Хранить конъюгат антител с серебром при -20°C до использования.

2.4.6 Методика записи вольтамперограмм

Общий объем электрохимической ячейки составлял 7,0 мл раствора фонового электролита, который готовили путём смешения 1050 мкл азотной кислоты (1М) с 560 мкл нитрата калия (0,5 М) и добавляли 5390 мкл деионизированной воды. Для выполнения анализа собирали трехэлектродную ячейку, которая состояла из рабочего углеродсодержащего электрода с обновляемой поверхностью и хлоридсеребряных, которые использовались в качестве электродов сравнения и вспомогательный.

Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору TA-Lab. Использовался постоянноточковый режим анодной инверсионной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала составляла $V=40$ мВ/с, рабочий диапазон потенциалов от минус 0,2 В до 0,6 В. Раствор перемешивался с помощью вибрации электродов на уровне 6. Потенциал накопления составил минус 0,6 В, время накопления - 80 секунд. Успокоение раствора осуществляли в течении 5ти секунд. Затем была снята

вольтамперограмма фонового электролита в указанной области потенциалов. Съемку вольтамперограмм повторяли 3 раза.

2.4.7 Методика десорбции антигена ВКЭ с алюминием гидроксида

Для определения антигена ВКЭ методом вольтамперометрии использовали вакцину клещевого энцефалита культуральную очищенную концентрированную инактивированную сорбированную – ЭнцеВир.

Перед постановкой вольтамперометрического анализа была проведена предварительная десорбция антигена ВКЭ с алюминием гидроксида, центрифугируя 350 мкл образца вакцины при 6000 об/мин в течение 5 минут при температуре от 15⁰С до 25⁰С [41]. Для дальнейшей работы отбирали 250 мкл надосадочной жидкости и помещали в эппендорф. Осадок, который остался на дне эппендорфа, был растворен в 250 мкл буферного раствора для десорбции, тщательно перемешен и оставлен на ночь в холодильнике при температуре 4⁰С. Затем центрифугировали при тех же условиях, что описаны выше.

Состав буферного раствора для десорбции:

Желатин - 50 мг («Aldrich» Е Ф., США кат. №27,162-4);

Натрий фосфорнокислый двузамещенный - 2,84 г (ГОСТ 4172-76, ФС 42-2398-94);

Трилон Б (ЭДТА) - 55 мг (ГОСТ 10652-73);

Твин 20 - 50 мкл («Aldrich», Е.Ф., США кат. № 27,934-8);

Вода очищенная (ФСП 42-2619-97) до 50 мл

Хранить при комнатной температуре от 18⁰С до 25⁰С не более 1 месяца.

2.4.8 Методика определения антигена вируса клещевого энцефалита в образцах

Для определения антигена ВКЭ, в первую очередь, использовали контрольные положительные (содержащие антиген) и отрицательные (не содержащие антиген) образцы из набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита (ВектоВКЭ-антиген, АО

«Вектор-бест», г. Новосибирск). После того, как были проведены исследования на модельных образцах, нами была проанализирована вакцина клещевого энцефалита ЭнцеВир (НПО «Вирион», г. Томск).

Этапы анализа, связанные с формированием комплексов антиген-антитело, было решено проводить в лунках титровального планшета. Также проводили усиление сигнала серебра серебром путем внесения нитрата серебра (1%) и химического восстановителя – метол (1%). Соотношение 1:1, время проявления составило 2 минуты.

Последовательность эксперимента (рис. 2.2):

1. Раскапать исследуемые образцы по 75 мкл в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к ВКЭ;
2. Инкубировать 1 час при температуре 37°C, 250 об/мин на термошейкере
3. Промыть лунки планшета промывочным раствором ФСБ-Т*25, взятым из набора ВектоВКЭ-антиген, методом вытряхивания на салфетку 3 раза по 100 мкл;
4. После промывки в лунки внести по 100 мкл серебряного биоконъюгата и повторить п.2;
5. Пока идет инкубирование, необходимо приготовить нитрат серебра 1%, для это была взята навеска 0,005 г на 500 мкл деионизированной воды;
6. После инкубирования, содержимое лунок вытряхнуть на салфетку, без промывки;
7. Приготовить проявитель (метол). Его необходимо готовить непосредственно перед использованием;
8. После того, как проявитель был готов, в лунки вносили по 100 мкл нитрата серебра 1% и по 100 мкл проявителя;
9. Содержимое лунок оставляли на 2 минуты и повторяли п.3;
10. После промывки внесли в лунки по 200 мкл концентрированной уксусной кислоты (растворитель);
11. Регистрация токов в программе «Определение Ag в воде». Фон нитрат калия 0,040 М + азотная кислота 0,15 М ($V_{\text{электролита}}=7\text{мл}$).

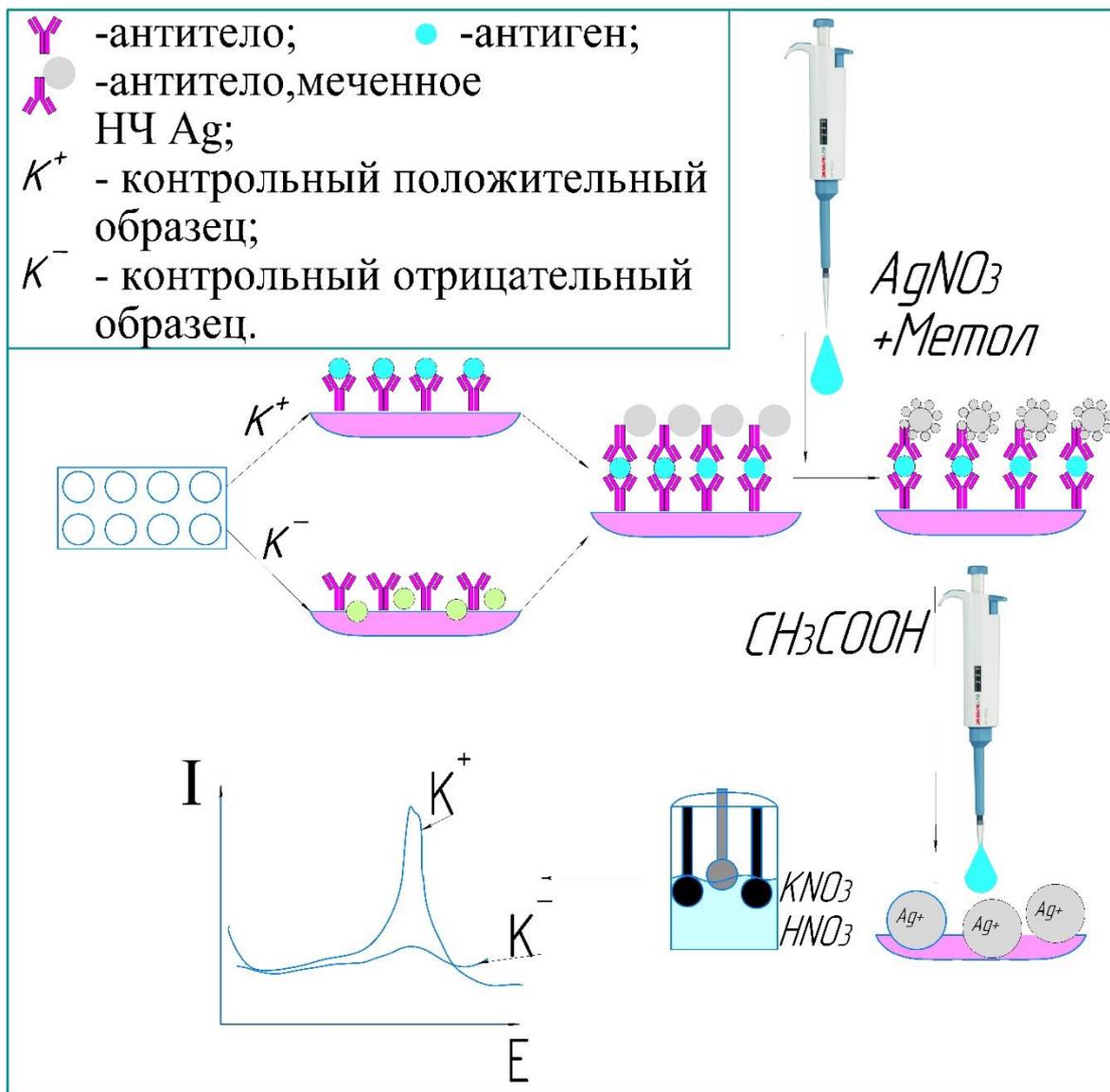


Рисунок 2.2 – Схема электрохимического иммуноанализа

Глава 3 Результаты и обсуждения

Принципиальная схема твердофазного непрямого неконкурентного электрохимического иммуносенсора по типу «Сэндвич» для определения антигена ВКЭ и ее описание представлены в разделе 2.4.8.

В работе использовалась коммерческая тест-система, в лунках которой иммобилизованы моноклональные антитела против ВКЭ (ВектоВКЭ-антиген, АО «Вектор-бест», г. Новосибирск).

В набор реагентов ВектоВКЭ-антиген входят следующие растворы для проведения непрямого неконкурентного твердофазного электрохимического иммуноанализа по типу «сэндвич»: K^+ - контрольный положительный образец, содержащий антиген ВКЭ; K^- - контрольный отрицательный образец, который не содержит антиген ВКЭ; антивидовые моноклональные противоклещевые антитела различных концентраций; ФСБ-Т×25 – 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для промывания планшетов.

Кроме того, во всех коммерческих тест-системах используют ферментную метку, выбор которой определяется ее высокой удельной каталитической активностью и простотой обнаружения. Но у ферментной метки есть такие недостатки, как длительное время анализа, связанное с включением дополнительного этапа постановки ферментной реакции с использованием стоп-реагентов, ограниченный срок службы. Поэтому, в работе было предложено заменить ферментную метку конъюгатов антител на НЧ серебра, которые обладают такими преимуществами как, стабильность и биосовместимость с антителами, дешевизна, высокая электрохимическая активность. Таким образом, в работе предложено заменить ферментную метку на НЧ серебра, при синтезе конъюгата с антивидовыми противоклещевыми антителами (IgG). Большое внимание уделено подбору рабочих условий регистрации аналитического сигнала от НЧ серебра и их конъюгатов $Ab@Ag$ методом анодной инверсионной вольтамперометрии. Разработана модельная тест-система определения антигена

ВКЭ с использованием конъюгатов Ab@Ag. Проведена апробация тест-системы по оценке содержания рекомбинантного белка, обладающего свойствами антигена ВКЭ, в вакцине «ЭнцеВир».

3.1 Характеристика наночастиц серебра

Наночастицы серебра были синтезированы по методике, представленной в разделе 2.4.1. Полученный коллоид имеет светло-желтый цвет, который можно увидеть на рисунке 3.1.

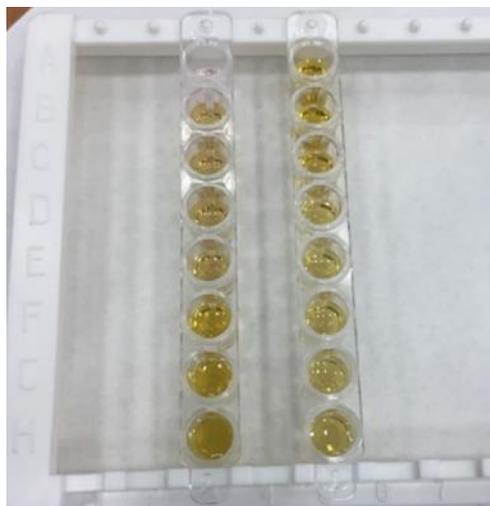


Рисунок 3.1 – Наночастицы серебра после синтеза.

Также можно отметить, что на основании молярного соотношения боргидрида натрия по отношению к нитрату серебра и экспериментальных условий, использованных в синтезе, форма и размер наночастиц могут значительно варьироваться [42].

При помощи спектрофотометрического анализа можно идентифицировать образование НЧ серебра. Исходя из литературных данных, серебряный коллоид имеет характерный пик поглощения в диапазоне длин волн от 390 нм до 400 нм [39]. После синтеза НЧ серебра химическим методом были записаны их спектры поглощения (рис. 3.2).

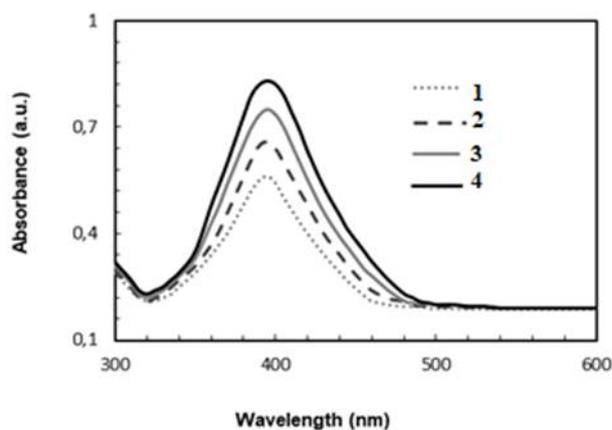


Рисунок 3.2 – Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag при различных концентрациях:

1 – $1.6 \cdot 10^{-4}$ М; 2 – $1.9 \cdot 10^{-4}$ М; 3 – $2.2 \cdot 10^{-4}$ М; 4 – $2.5 \cdot 10^{-4}$ М.

Из рисунка 3.2 можно увидеть, что полученные НЧ серебра имеют пик поглощения при длине волны 395 нм, что соответствует литературным данным. Также можно отметить, что при увеличении концентрации коллоида серебра в растворе, их пик поглощения возрастает.

Морфология НЧ серебра была описана с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). На рисунке 3.3 мы видим, что полученные НЧ серебра имеют сферическую форму.

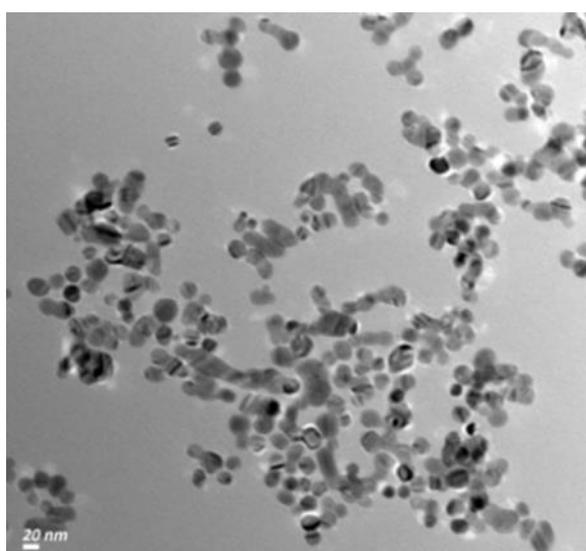


Рисунок 3.3 – ПЭМ НЧ серебра после синтеза и концентрирования.

Согласно данным рисунка 3.4, на котором изображена гистограмма распределения НЧ серебра по размерам, средний размер коллоида составляет от 14 нм до 16 нм.

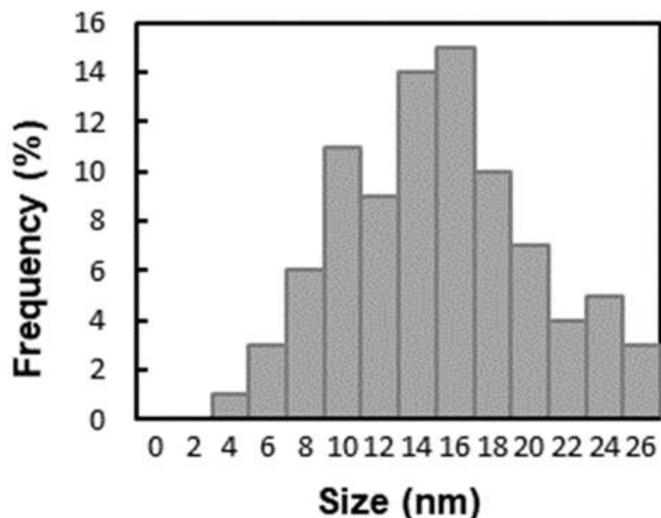


Рисунок 3.4 – Гистограмма распределения НЧ серебра по размерам.

Также в работе проводились исследования вольтамперометрических свойств, полученных НЧ серебра, в режиме анодной инверсионной вольтамперометрии. На рисунке 3.5 представлены вольтамперограммы НЧ серебра в фоновом электролите ($V_{\text{электролита}}=7$ мл).

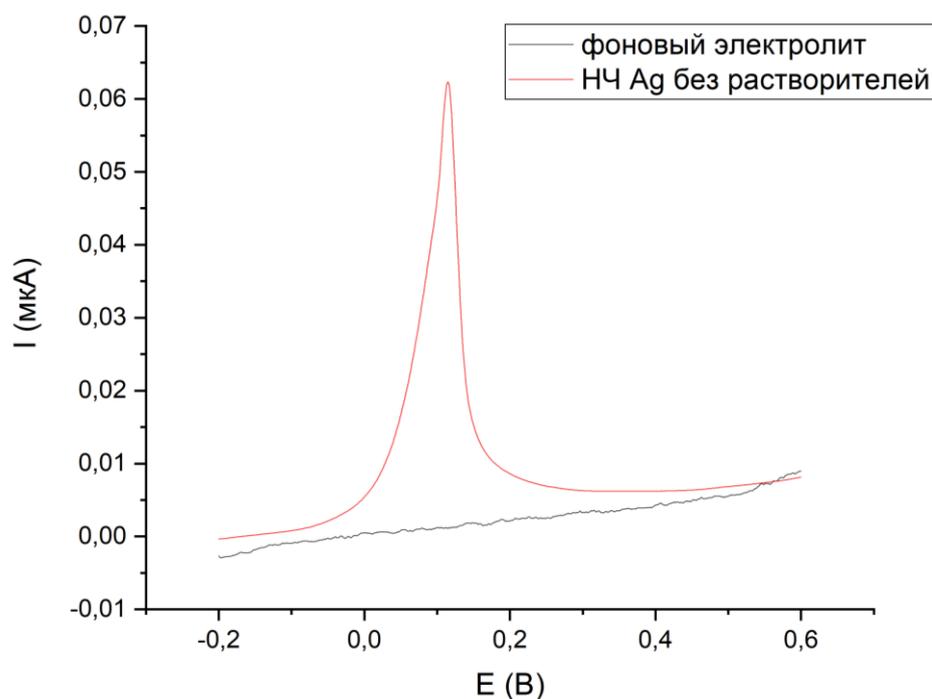
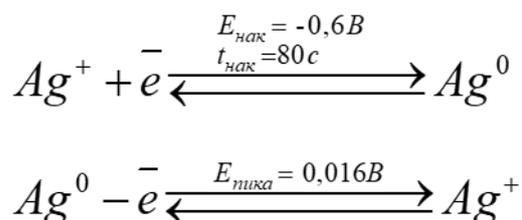


Рисунок 3.5 –Анодные инверсионные вольтамперограммы НЧ серебра.
 $V=40$ мВ/с; $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,600$ В; $t_{\text{нак}}=80$ с; фон: $(0,040$ М $\text{KNO}_3 + 0,15$ М $\text{HNO}_3)$; $V_{\text{НЧ серебра}}=20$ мкл

Согласно рисунку 3.5 потенциал окисления серебра происходит при $+0,200$ В.

В соответствии с инверсионными вольтамперометрическими (ИВ) условиями регистрации сигнала от НЧ серебра первоначально происходит накопление Ag^0 на поверхности УСЭ из коллоида при потенциале и времени накопления минус $0,600$ В и 80 секунд соответственно. При развертке потенциала от -0.2 до $+0.6$ В регистрируется сигнал окисления Ag^0 согласно схеме:



Известно, что НЧ серебра стабилизированы боргидридной оболочкой [43], которая препятствует накоплению серебра конъюгатов на поверхности УСЭ в режиме инверсионной вольтамперометрии (ИВ) (рис.3.6).

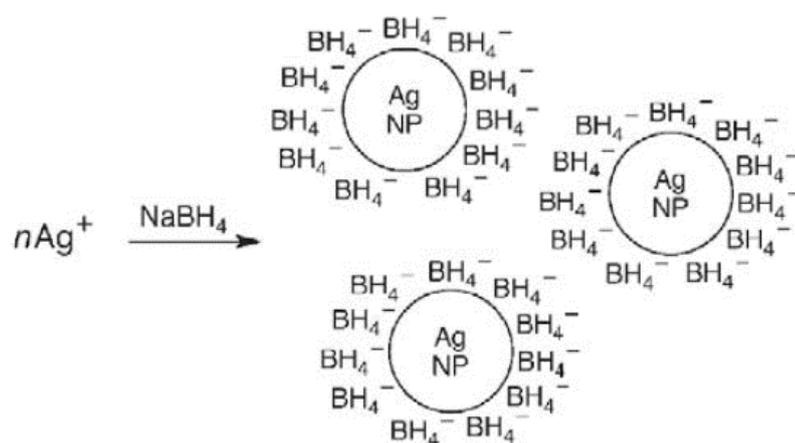


Рисунок 3.6 – НЧ серебра, стабилизированные анионной боргидридной оболочкой

Для того, чтобы повлиять на чувствительность ИВ сигнала от НЧ серебра, необходимо перевести коллоид в ионное состояние. Это, в свою очередь, позволит улучшить стадию накопления серебра из конъюгата на электроде и количественно перенести все ионное серебро из лунки планшета в электрохимическую ячейку. Таким образом, важным аспектом в работе является подбор растворителя, разрушающий коллоидное серебро конъюгатов Ab@Ag в лунках титровального планшета. Для этих целей было апробировано несколько растворителей: перекись водорода 3%, азотная кислота концентрированная, трет-бутилгидропероксид 70% и уксусная кислота концентрированная.

Лучшим растворителем коллоидных частиц, согласно рисунку 3.7, является органическая перекись, тогда как уксусная кислота является худшим растворителем.

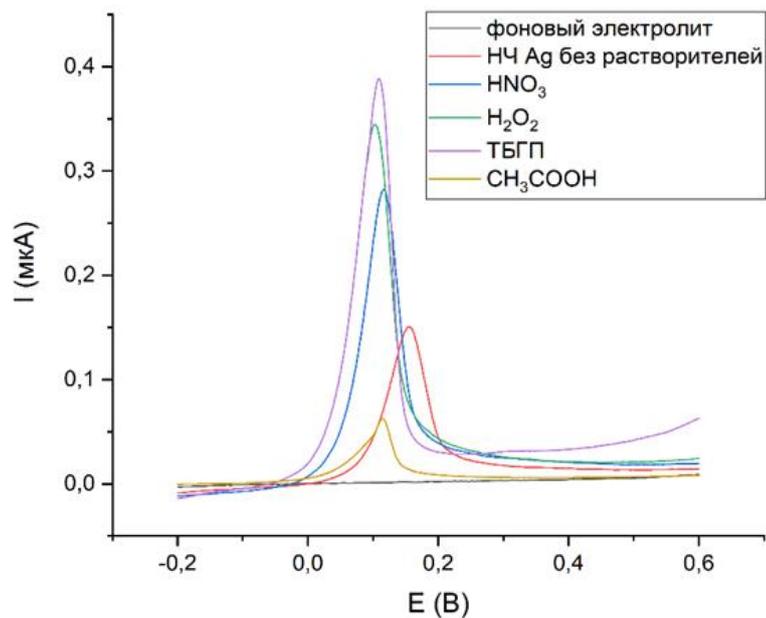


Рисунок 3.7 – Анодные инверсионные вольтамперограммы НЧ серебра после растворения в различных растворителях.

$V=40$ мВ/с; $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,600\text{В}$; $t_{\text{нак}}=80\text{с}$; фон: (0,040 М KNO_3 + 0,15 М HNO_3); $V_{\text{НЧ серебра}}=20$ мкл; $V_{\text{р-ля}}=200$ мкл

Данные вольтамперограмм согласуются со спектрами поглощения НЧ серебра до и после растворения в различных растворителях (рис. 3.8).

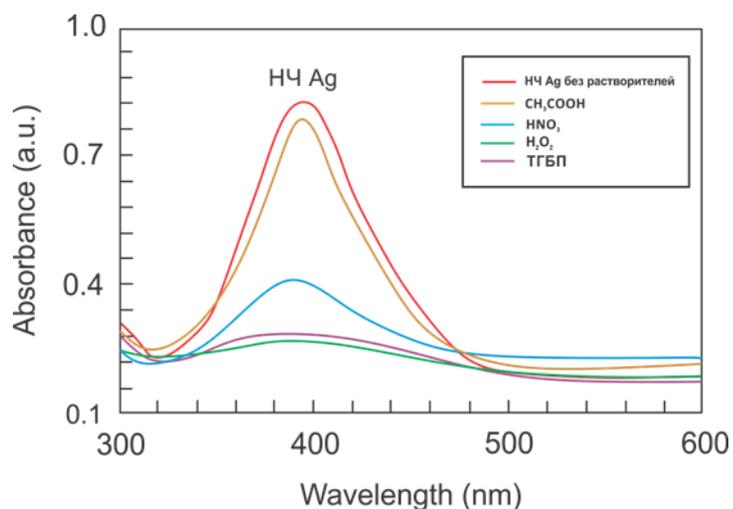


Рисунок 3.8 – Спектры поглощения НЧ серебра в различных растворителях

По спектрам, представленным на рисунке 3.8 видно, что максимумы поглощения НЧ серебра уменьшаются, а в некоторых случаях исчезают, в зависимости от природы растворителя. Лучшим растворителем коллоидного серебра является органическая перекись. Кроме того, наши результаты подтверждаются литературными данными, в которых сказано, что перекись водорода как органическая, так и не органическая, позволяют растворить коллоид, высвобождая ионное серебро [44].

В результате эксперимента были получены НЧ серебра сферической формы, со средним диаметром 14-16 нм, которые в дальнейшем использовали для получения конъюгатов с БСА (БСА@Ag) и антивидовыми моноклональными противоклеточными антителами (Ab@Ag). Также было выяснено, что для растворения коллоида лучше всего использовать трет-бутилгидропероксид 70%.

3.2 Характеристика конъюгатов наночастиц серебра с бычьим сывороточным альбумином (БСА)

Как известно, модификация поверхности наночастиц антителами, антигенами и белками является альтернативным подходом для стабилизации наночастиц [45]. Бычий сывороточный альбумин (БСА), белок плазмы, как было отмечено, проявляет сильное сродство к неорганическим наночастицам и служит эффективным защитным средством для предотвращения агрегации наночастиц [46,47]. Поэтому БСА был выбран в качестве модельного белка, который бы показывал модель связывания антител с НЧ серебра, так как он самый дешевый и его часто используют в качестве блок-реагента для блокирования несвязанных коллоидных частиц. БСА был приготовлен в водном растворе концентрацией 1%. Затем был получен конъюгат БСА@Ag методом пассивной адсорбции, описанным в разделе 2.4.3.

В качестве подтверждения того, что образовался конъюгат БСА@Ag, были записаны спектры поглощения НЧ серебра и БСА@Ag (рис. 3.9).

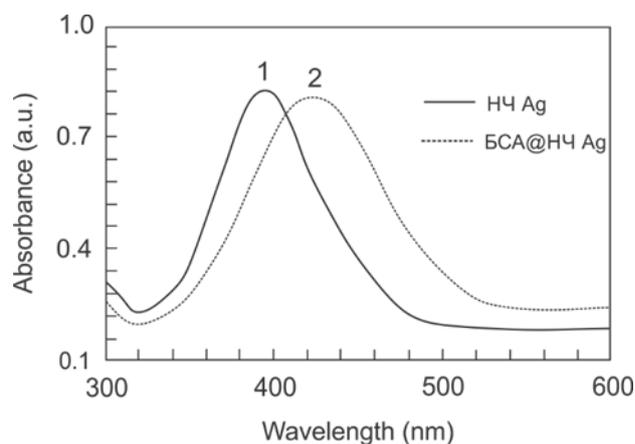


Рисунок 3.9 – Спектры поглощения НЧ серебра и конъюгата БСА@Ag

На данном рисунке можно увидеть характерный пик поглощения от НЧ серебра при длине волны 395 нм, тогда как при взаимодействии НЧ серебра с БСА, полученный пик смещен в более длинноволновую область при $\lambda=420$ нм.

Кроме того, нами была проведена работа по исследованию свойств конъюгатов БСА@Ag. На рисунке 3.10 представлены вольтамперограммы НЧ серебра и конъюгатов БСА@Ag.

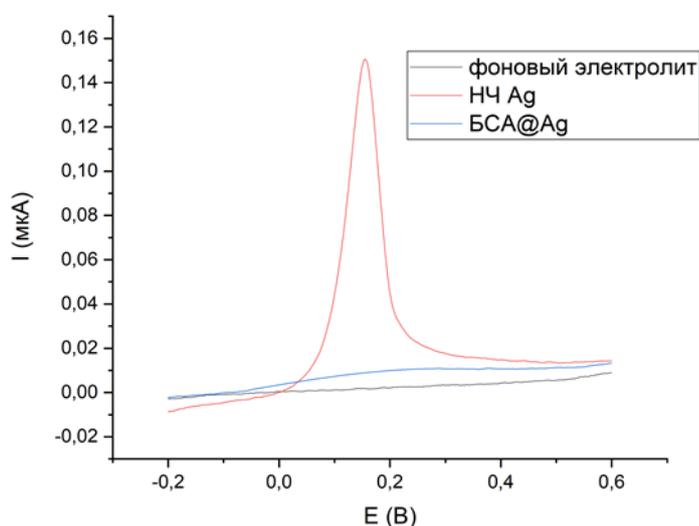


Рисунок 3.10 – Анодные инверсионные вольтамперограммы НЧ серебра и конъюгатов БСА@Ag.

$V=40$ мВ/с; $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,600\text{В}$; $t_{\text{нак}}=80\text{с}$; фон: $(0,040 \text{ М } \text{KNO}_3 + 0,15 \text{ М } \text{HNO}_3)$; $V_{\text{НЧ серебра}}=20 \text{ мкл}$; $V_{\text{БСА@Ag}}=100 \text{ мкл}$

Из данного рисунка мы видим, что белок пассивирует поверхность электрода, поэтому необходимо подобрать соответствующий растворитель, устраняющий эту проблему. Однако, после получения конъюгата БСА@Ag спустя 24 часа его хранения, было замечено, что тот набор растворителей, который хорошо разрушал коллоид в первом случае, когда не было белка в системе, не подходит для растворения серебра из конъюгата БСА@Ag.

На основании литературных данных известно, что при хранении НЧ серебра с растворами белков происходит формирование новой фазы Ag_2S вокруг НЧ серебра [28]. В литературных источниках эта фаза называется «жесткой короной» [48]. Для проверки этих данных нами были записаны ПЭМ НЧ серебра сразу после получения конъюгата БСА@Ag и спустя 24 часа (рис. 3,11 А; 3.12).

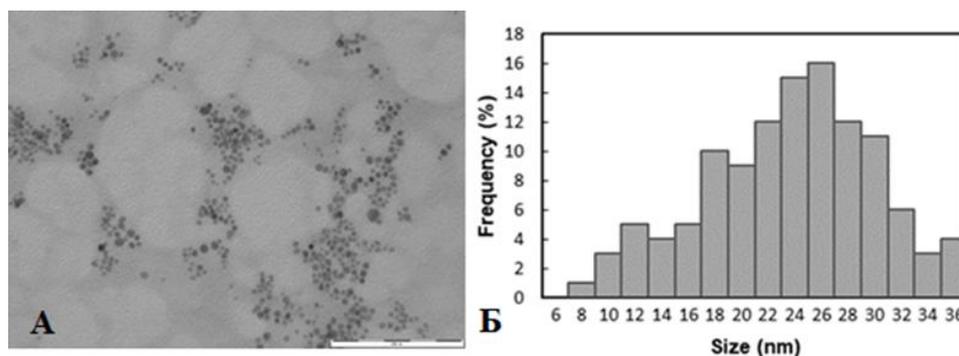


Рисунок 3.11 – А – ПЭМ конъюгата БСА@Ag сразу после синтеза; Б – Гистограмма распределения по размерам НЧ серебра, стабилизированных БСА

На рисунке 3.11 А мы видим, что НЧ серебра стабилизированы БСА и картина распределения достаточно равномерна. Согласно данным рисунка 3.11 Б, на котором изображена гистограмма распределения НЧ Ag, стабилизированных БСА, по размерам, средний размер конъюгатов составляет 24 ± 2 нм. Если сравнивать гистограмму распределения НЧ серебра относительно гистограммы распределения конъюгатов БСА@Ag по размерам, можно сделать вывод, что средний размер коллоида без белка на 10 нм меньше, чем конъюгат БСА@Ag. Стабилизированные белком НЧ серебра отличаются в размерах за счет того, что БСА расположены на поверхности коллоида, что приводит к

укрупнению частиц. Нами замечено, что после суточного хранения конъюгатов БСА@Ag НЧ серебра образуют крупные конгломераты, вокруг которых образуется мелкая фаза, что затрудняет обработку изображения ПЭМ и построения гистограммы распределения частиц по размерам (рис. 3.12).

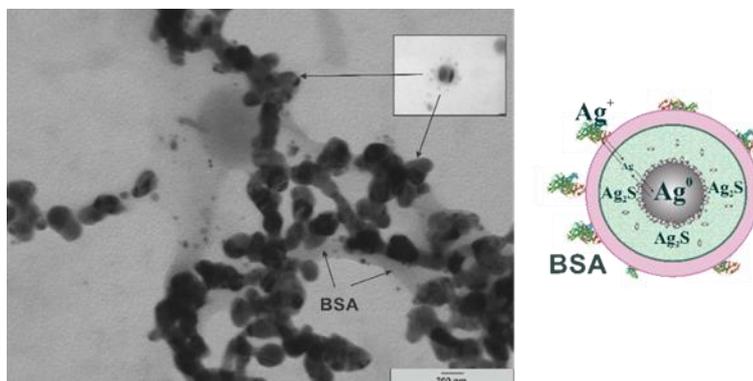


Рисунок 3.12 – ПЭМ конъюгата БСА@Ag, спустя 24 часа

На основании литературных данных [28,48], а также наглядной картинке ПЭМ и гистограммы распределения НЧ серебра, стабилизированных БСА, мы предполагаем, что в процессе хранения НЧ серебра обрастают новой фазой из сульфида серебра, т.е. формируется «жесткая корона». Наши предположения были подтверждены путем эксперимента подбора различных растворителей для НЧ серебра с БСА после суточного хранения. После процедуры растворения конъюгатов БСА@Ag (спустя 24 ч) в различных растворителях были записаны ИВА и спектры поглощения (рис. 3.13, 3.14).

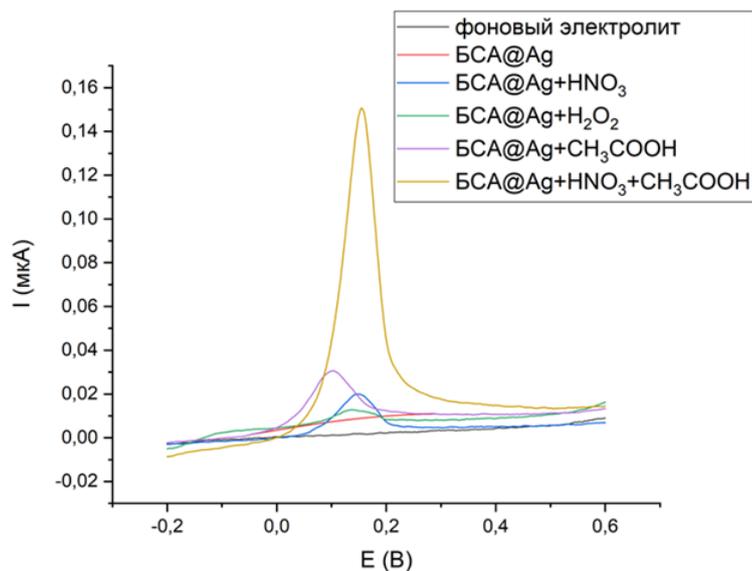


Рисунок 3.13 – Анодные инверсионные вольтамперограммы конъюгатов БСА@Ag в различных растворителях.

$V=40$ мВ/с; $E_{\text{нак}}=$ минус $0,600\text{В}$; $t_{\text{нак}}=80\text{с}$; фон: ($0,040$ М KNO_3 + $0,15$ М HNO_3); $V_{\text{BSA@Ag}}=100$ мкл

Из рисунка 3.13 мы видим, что «жесткая корона» хорошо растворяется в уксусной кислоте. Это связано с тем, что сульфид серебра хорошо растворяется именно в данном растворителе. Также, полученные данные согласуются со спектрами поглощения конъюгата БСА@Ag в различных растворителях (рис. 3.14), из которых видно, что лучшим растворителем является смесь уксусной кислоты и азотной, тогда как худший растворитель – перекись водорода. Хотя белок денатурирует во всех растворителях, но перекись быстро разлагается и не является растворителем сульфида серебра.

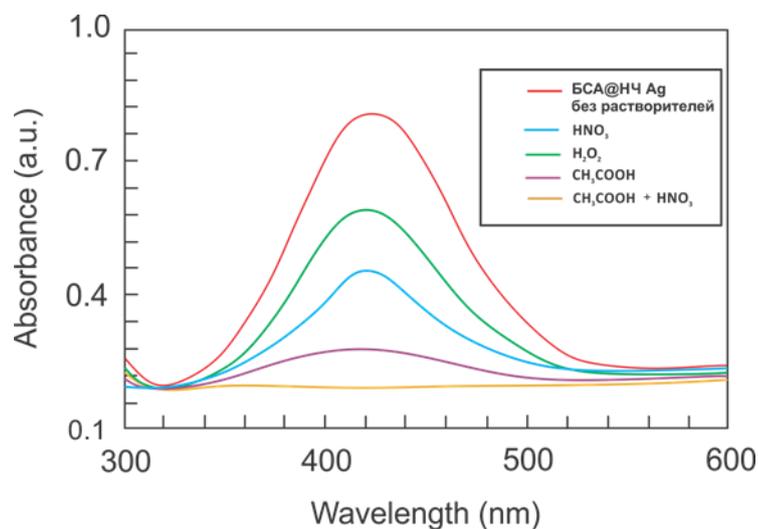


Рисунок 3.14 – Спектры поглощения конъюгата БСА@Ag в различных растворителях

На основании, полученных данных, нами была подобрана эффективная смесь растворителей – это уксусная и азотная кислоты. В данном случае уксусная кислота позволяет растворять поверхностный слой сульфида серебра, тогда как азотная кислота разрушает сам серебряный коллоид.

Таким образом, был подобран эффективный растворитель серебра конъюгатов БСА@Ag, используемый для извлечения серебра из лунок титровального планшета, с последующим переносом пробы в электрохимическую ячейку. Кроме того, мы рекомендуем использовать в качестве эффективного растворителя конъюгата с антителами Ab@Ag уксусную кислоту, а в состав фонового электролита включать азотную кислоту.

3.3 Сборка тест-системы и усиление сигнала серебра

3.3.1 Характеристика конъюгатов НЧ серебра с антивидовыми моноклональными противоклещевыми антителами

Для апробации тест-системы были получены конъюгаты НЧ серебра с антивидовыми моноклональными антителами (Ab@Ag) по методике, описанной

в разделе 2.4.4. Морфология конъюгата была описана с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 3.15).

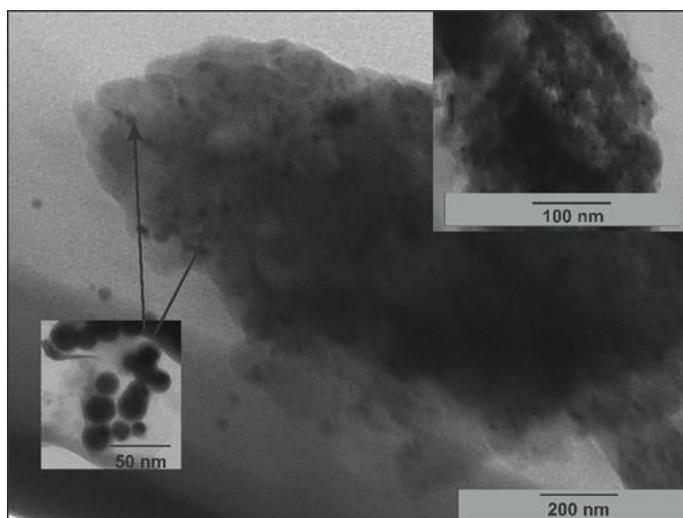


Рисунок 3.15 – ПЭМ конъюгата Ab@Ag

Как видно из рисунка, иммуноглобулины связываются с НЧ серебра. При более близком разрешении видна более мелкая фаза «жесткой короны» Ag_2S .

На основе конъюгата БСА@Ag был подобран эффективный растворитель, который бы растворял как сульфид серебра, так и сам коллоид. Поэтому на рисунке 3.16 представлены спектры поглощения конъюгатов БСА@Ag, Ab@Ag без растворителя и с растворителем.

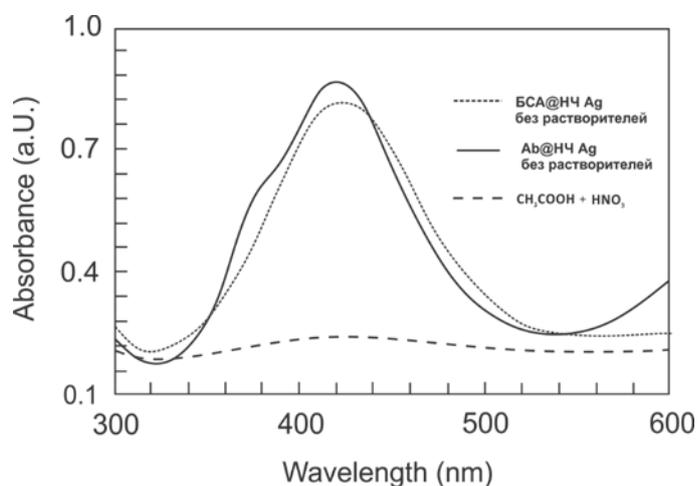


Рисунок 3.16 – Спектры поглощения конъюгатов БСА@Ag, Ab@Ag без растворителя и с растворителем

Из рисунка видно, что пик поглощения конъюгата $Ab@Ag$ без растворителя виден при длине волны 420 нм, тогда как с растворителем пик поглощения исчезает. Это говорит о том, что подобранный нами растворитель растворяет конъюгат $Ab@Ag$ и серебро переходит в ионное состояние.

3.3.2 Усиление сигнала серебра

Для выявления антигена ВКЭ нами была собрана модельная тест-система, являющаяся аналогом непрямого неконкурентного твердофазного ИФА по типу «сэндвич». Для иммобилизации антигена использовали титровальные микропланшеты с иммобилизованными антивидовыми моноклональными противоклещевыми антителами IgG, контрольные положительные (содержащие антиген, K^+) и отрицательные (не содержащие антиген, K^-) образцы из набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита (ВектоВКЭ-антиген, АО «Вектор», г. Новосибирск). После иммобилизации антигена и промывки планшетов в каждую лунку вносились конъюгаты $Ab@Ag$. Далее, алгоритм анализа антигена включал этап растворения серебра конъюгатов с последующим переносом содержимого лунок планшета в электрохимические ячейки (см. схему анализа, раздел 2.4.8).

Для определения антигена вируса клещевого энцефалита в образцах после растворения серебра конъюгатов был использован метод анодной инверсионной вольтамперометрии (см. раздел 2.4.8). На рисунке 3.17 представлены вольтамперограммы контрольных положительных (K^+) и контрольных отрицательных (K^-) образцов.

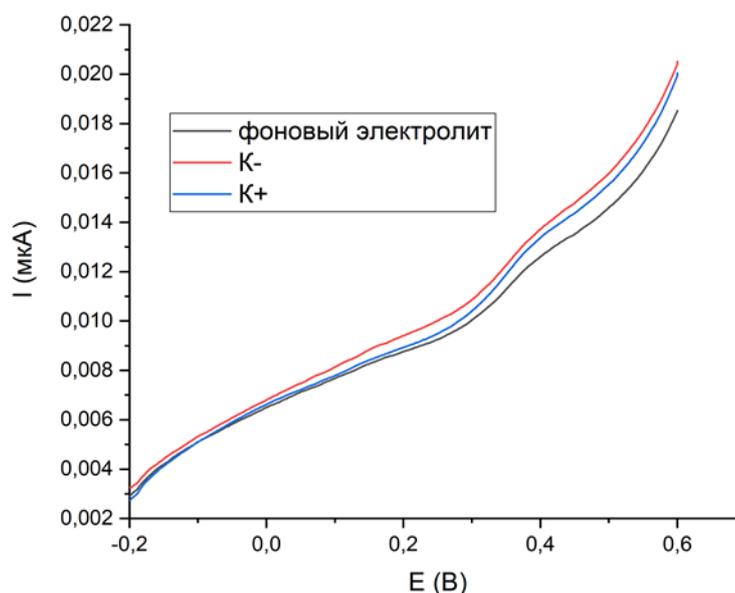


Рисунок 3.17 –Анодные инверсионные вольтамперограммы серебра конъюгатов Ab@Ag после сборки тест-системы:

K⁺ - контрольные положительные образцы;

K⁻ - контрольные отрицательные образцы

V=40 мВ/с; E_{нак}= минус 0,600В; t_{нак}=80с; фон: (0,040 М KNO₃ + 0,15 М HNO₃); V_{K⁺K⁻} = 75 мкл; V_{Ab@Ag} =100 мкл; V_{р-ля}=200 мкл

Из рисунка видно, что сигнала от НЧ серебра не наблюдается как в отрицательных образцах, в которых не содержится антиген, так и в положительных, которые содержат антиген.

В связи с тем, что от конъюгата Ab@Ag не был получен сигнал, было принято решение усилить сигнал серебра серебром, используя коллоидные частицы конъюгатов в качестве катализаторов роста новых кристаллов из ионной фазы в присутствии химического восстановителя метола [49] с последующей регистрацией ИВА (рис. 3.18). Методика проявления серебра на НЧ серебра представлена в разделе 2.4.8.

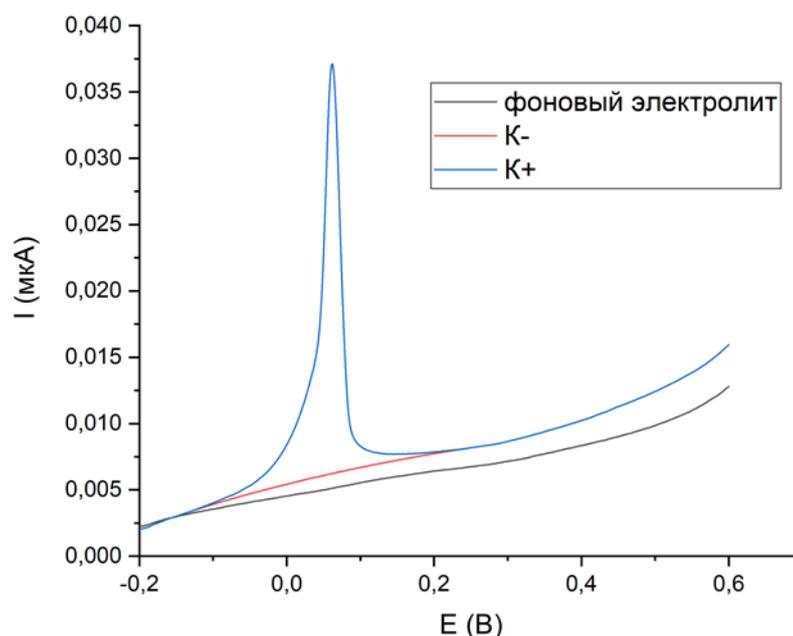


Рисунок 3.18 – Анодные инверсионные вольтамперограммы конъюгатов Ab@Ag после сборки тест-системы и усиления серебра:

K⁺ - контрольный положительный образец;

K⁻ - контрольный отрицательный образец

V=40 мВ/с; E_{нак}= минус 0,600 В; t_{нак}=80с; фон: (0,040 М KNO₃ + 0,15 М HNO₃); V_{K⁺,K⁻} = 75 мкл; V_{Ab@Ag} =100 мкл; V_{р-ля}=200 мкл

На рисунке 3.18 можно увидеть, что после каталитической стадии проявления ионного серебра на НЧ серебра в присутствии восстановителя метола 0,1% в положительном контрольном образце наблюдается пик. Это означает, что в нем содержится антиген ВКЭ, тогда как в контрольном отрицательном образце не наблюдается пик, соответственно данный образец не содержит антиген ВКЭ.

3.3.3 Апробация электрохимического иммуносенсора по определению рекомбинантного белка в вакцине ЭнцеВир

Обязательным этапом контроля качества вакцин является определение подлинности по содержанию рекомбинантного белка, обладающим свойствами

антигена в отношении ВКЭ. Наш электрохимический иммуносенсор обладает такими преимуществами, как дешевизна и экспрессность, поэтому предложено использовать ее для определения рекомбинантного белка, обладающего антигенными свойствами КЭ в вакцине ЭнцеВир.

Перед постановкой инверсионного вольтамперометрического анализа была проведена предварительная десорбция антигена ВКЭ с алюминием гидроксида по методике, представленной в разделе 2.4.7.

Пробоподготовка играет важную роль в анализе вакцины ЭнцеВир. В процессе получения вакцины часть антигена может оставаться на микрочастицах гидроксида алюминия, поэтому методика пробоподготовки включала анализ самой вакцины и анализ фракций после центрифугирования

Вольтамперометрические исследования проводились как в самой вакцине, так и после десорбции антигена с частиц гидроксида алюминия (рис. 3.19).

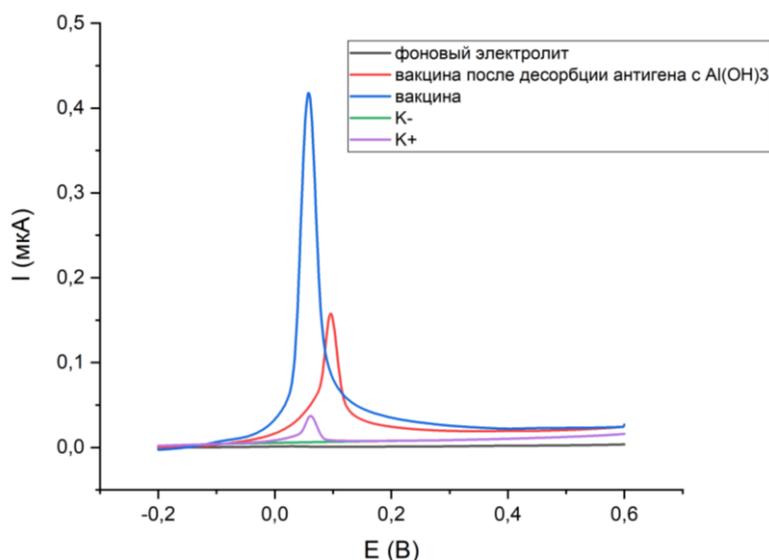


Рисунок 3.19 – Анодные инверсионные вольтамперограммы серебра конъюгатов Ab@Ag тест-системы, используемой для анализа вакцины, фракций после десорбции антигена вакцины с частиц гидроксида алюминия,

К⁺ - контрольный положительный образец,

К⁻ - контрольный отрицательный образец.

$V=40$ мВ/с; $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,600$ В; $t_{\text{нак}}=80$ с; фон: (0,040 М KNO_3 + 0,15 М HNO_3); $V_{\text{К}^+, \text{К}^-} = 75$ мкл; $V_{\text{Ab@Ag}} = 100$ мкл; $V_{\text{р-ля}} = 200$ мкл

Согласно рисунку 3.19 можно увидеть, что в самой вакцине содержится много рекомбинантного белка, значение которого выше контрольного положительного образца (K^+). Также этап десорбции антигена с частиц гидроксида алюминия необходим для пробоподготовки вакцины, т.к. часть антигена сорбируется на частицах $Al(OH)_3$, что подтверждено результатами определения антигена после десорбции с использованием разработанной тест-системы. Результаты обобщены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Сравнение методов определения антигена ВКЭ

Объект исследования	ИФА, оптическая плотность, А	Электрохимический иммуносенсор, ток, мкА
Контрольный положительный образец (K^+)	2,80±0,05	0,227±0,023
Контрольный отрицательный образец (K^-)	0,20±0,05	0,00065±0,00007
Вакцина ЭнцеВир	>3,5	0,534±0,053

Полученные результаты согласуются с значениями оптических плотностей метода ИФА (ВекторВКЭ-антиген, АО «Вектор-бест»).

Таким образом конъюгаты $Ab@Ag$ и предложенный электрохимический иммуносенсор пригодны для определения рекомбинантных белков, обладающих антигенными свойствами КЭ. Иммуносенсор после доработки может быть использован для определения антигена ВКЭ в крови человека и животных.

Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1 Предпроектный анализ

Научно-исследовательская работа связана с разработкой электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита в организме человека. Каждый год на территории нашей страны регистрируется около 5-6 тысяч случаев заражения вирусом клещевого энцефалита, поэтому очень важно обнаружить его на ранних стадиях заболевания. Ранняя диагностика является ключом к улучшению прогноза клещевого энцефалита, за счет определения антигенов вируса клещевого энцефалита в сыворотке крови человека.

На сегодняшний день самым распространенным методом анализа на наличие вируса клещевого энцефалита является твердофазный непрямой неконкурентный иммуноферментный анализ формата «сэндвич». Но у этого метода есть такие недостатки, как длительное время анализа, связанное с включением дополнительного этапа постановки ферментной реакции с использованием стоп-реагентов, ограниченный срок службы и низкая селективность. В связи с этим создание иммуносенсора может послужить альтернативой в проведении анализа. Одной из задач нашего исследования является определение антигена вируса клещевого энцефалита вольтамперометрическим методом анализа.

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Потенциальными потребителями являются различные медицинские учреждения, проводящие анализы крови, а также фармацевтические компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей, диагностические центры.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

В лабораторной диагностике по определению антигена вируса клещевого энцефалита применяются два основных метода анализа: иммуноферментный и полимеразная цепная реакция. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum B_i \times B_i, \quad (1)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

B_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

Целесообразно проводить данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Оценочная карта сравнения конкурентных разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		$B_{\text{ф}}$	$B_{\text{к1}}$	$B_{\text{к2}}$	$K_{\text{ф}}$	$K_{\text{к1}}$	$K_{\text{к2}}$
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Точность определения	0,1	4	5	4	0,4	0,5	0,4
2. Экспрессность	0,2	5	2	2	1	0,4	0,4
3. Простота эксплуатации	0,1	5	4	4	0,5	0,4	0,4
Итого по техническим критериям					1,9	1,3	1,2
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Конкурентоспособность продукта	0,1	3	5	3	0,3	0,5	0,3
2. Стоимость оборудования	0,2	5	4	3	0,5	0,4	0,3
3. Затраты на подготовку специалиста	0,1	4	4	3	0,4	0,4	0,3
4. Стоимость реактивов	0,2	4	4	3	0,4	0,4	0,3

Продолжение таблицы 4.1

Итого по экономическим критериям					1,6	1,7	1,2
Итого	1	30	28	22	3,5	3,0	2,4

Б_ф – наша разработка;

Б_{к1} – иммуноферментный анализ;

Б_{к2} – полимеразная цепная реакция.

По результатам оценочной карты сравнения конкурентных методов анализа по определению антигена вируса клещевого энцефалита можно сделать вывод о том, что основным конкурентом метода вольтамперометрии является иммуноферментный анализ.

4.2 SWOT-анализ

SWOT – Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы) – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Таблица 4.2 - Матрица SWOT

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>С1. Экспрессность</p> <p>С2. Простота эксплуатации</p> <p>С3. Низкие затраты на пробоподготовку</p> <p>С4. Селективность</p> <p>С5. Длительный срок хранения биоконъюгатов</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>Сл1. влияние размера НЧ на чувствительность определения ВКЭ</p> <p>Сл2.Необходимость прибора</p> <p>Сл3.Необходимость специализированных реактивов (антител, антигенов)</p>
--	--	--

Продолжение таблицы 4.2

<p>Возможности: В1. Появление дополнительного спроса на новый продукт В2. Разработка методики определения других антигенов В3. Перспективы внедрения вольтамперометрии в качестве метода анализа в медицине.</p>	<p>Благодаря возникновению спроса на новый продукт, появляется возможность использования его в качестве альтернативного метода анализа в медицине. Кроме того, возможно увеличить спектр определяемых антигенов.</p>	<p>Отсутствие у производителя квалифицированных кадров и долгий срок поставок материалов и оборудования могут негативно сказаться на успешном внедрении данного продукта, а соответственно, на его спросе.</p>
<p>Угрозы: У1. Развитие конкурентных методов анализа У2. Повышение стоимости оборудования У3. Отсутствие необходимых реактивов</p>	<p>Заявленная точность, низкая стоимость и экспрессность могут сделать предлагаемую методику конкурентоспособной.</p>	<p>Отсутствие спроса на новые методы и развитая конкуренция методов обусловлено тем, что данный продукт разрабатывается без прототипа научной разработки. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования приводит к тому, что для проведения испытаний и опытов не хватает оборудования и реактивов, которые приводят к большим затратам времени на проведение научных исследований.</p>

В результате SWOT-анализа выявлено, что для данного проекта характерен некий баланс сильных и слабых сторон, а также возможностей и угроз. При правильно разработанной концепции продвижения проекта, можно внедрить продукт на рынок производства и сбыта.

4.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации

При проведении анализа по таблице, приведенной ниже, по каждому показателю ставится оценка по пятибалльной шкале. При этом система измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработчика) отличается. Так, при оценке степени проработанности научного проекта 1 балл означает не проработанность проекта, 2 балла – слабую проработанность, 3 балла – выполнено, но в качестве не уверен, 4 балла – выполнено качественно, 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта. Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид: 1 означает не знаком или мало знаю, 2 – в объеме теоретических знаний, 3 – знаю теорию и практические примеры применения, 4 – знаю теорию и самостоятельно выполняю, 5 – знаю теорию, выполняю и могу консультировать.

Таблица 4.3 - Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1	Определен имеющийся научно-технический задел	5	4
2	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	4
3	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4
4	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	3	4

Продолжение таблицы 4.3

5	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
6	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	4
7	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	3
8	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	1	1
9	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	3
10	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	3	4
11	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	2	2
12	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	4
13	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	3
14	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	3
15	Проработан механизм реализации научного проекта	3	3
	ИТОГО БАЛЛОВ	47	49

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i \quad (2)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

B_i – балл по i -му показателю.

Значение $B_{\text{сум}}$ позволяет говорить о мере готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации. Так, если значение $B_{\text{сум}}$ получилось от 75 до 60, то такая разработка считается перспективной, а знания разработчика достаточными для успешной ее коммерциализации. Если от 59 до 45 – то перспективность выше среднего. Если от 44 до 30 – то перспективность средняя. Если от 29 до 15 – то перспективность ниже среднего. Если 14 и ниже – то перспективность крайне низкая.

Суммарное значение баллов данной таблицы позволяет говорить о готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации выше среднего.

4.4 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования

Существуют различные методы коммерциализации научных разработок. На данной стадии, представленной научной разработки, успешному продвижению способствует торговля патентными лицензиями, с помощью которой будет достигнута передача третьим лицам интеллектуальной собственности на лицензионной основе.

4.5 Инициация проекта

Таблица 4.4 - Цели и результат проекта

Цели проекта:	Разработать электрохимическую тест-систему для определения ВКЭ с использованием конъюгатов антител, меченных НЧ серебра
Ожидаемые результаты проекта:	Создание электрохимического иммуносенсора формата «сэндвич», работающего по принципу связывания «антиген-антитело»
Критерии приемки результата проекта:	Не использование вредных реактивов, получение новой методики определения антигена вируса клещевого энцефалита

Таблица 4.5 – Рабочая группа проекта

№, п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час
1	к.х.н., доцент (ОХИ, ИШПР) Дорожко Е.В.	Руководитель	Распределение обязанностей, корреляция выполнения плана, формирует цели проекта, ограничения проекта по срокам и затратам (бюджету), контроль над ходом выполнения проекта. Консультации по поводу проведения эксперимента, получения и анализа результатов НИР	250
2	Шевелева П.Г.	Исполнитель	Выполнение проекта (проведение эксперимента, получение и анализ результатов НИР)	520
ИТОГО:				770

4.6 Ограничения и допущения проекта

Таблица 4.6 – Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/Допущения
Бюджет проекта	
Источник финансирования	НИ ТПУ
Сроки проекта	
Дата утверждения плана управления проектом	20.02.2019
Дата завершения проекта	27.05.2020

4.7 Планирование управления научно-техническим проектом

4.7.1 Организационная структура проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рис. 4.1 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.



Рисунок 4.1 – Иерархическая структура работ проекта

4.7.2 План проекта

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

Таблица 4.7 - Календарный план проекта

Код работ ы (из ИСП)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончани я работ	Состав участников (ФИО ответствен ных исполните лей)
1	Введение	2	13.04.2020	15.04.2020	Шевелева П.Г. Дорожко Е.В.
2	Литературный обзор	15	18.01.2020	5.02.2020	Шевелева П.Г.
3	Теоретический анализ	10	1.03.2020	15.03.2020	Шевелева П.Г.
4	Постановка задачи исследования	7	1.12.2019	5.12.2019	Шевелева П.Г. Дорожко Е.В.
5	Экспериментальн ая часть	40	10.12.2019	3.02.2020	Шевелева П.Г. Дорожко Е.В.
6	Результаты и обсуждения	10	7.02.2020	17.02.2020	Шевелева П.Г. Дорожко Е.В.
7	Разработка презентации и раздаточного материала	5	16.04.2020	21.04.2020	Шевелева П.Г.
8	Оформление	5	23.04.2020	28.04.2020	Шевелева П.Г.
ИТОГО:		94			

Таблица 4.8 - Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Код работ ы (из ИСР)	Вид работ	Исполнители	Т _к , ка л, дн.	Декаб рь		Янв арь		Февра ль			Мар т			Апрел ь		
				1	2	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	Постановка задачи исследования	Руководитель, Магистрант	15	■												
2	Подбор и изучение материалов по теме	Магистрант	17								■					
3	Экспериментальная часть	Руководитель, магистрант	40	■			□									
4	Результаты и обсуждения	Руководитель, магистрант	10						■							
5	Разработка презентации и раздаточного материала	Магистрант													■	
6	Оформление	Магистрант													■	



- Магистрант



- Руководитель

4.8 Бюджет научного исследования

Расчет стоимости материальных затрат производится по действующим прейскурантам или договорным ценам. Результаты по данной статье заносятся в таблице 4.9.

Таблица 4.9 - Расчет затрат на сырье

п/п	Наименование затрат	Единица измерений	Расход	Цена за единицу, руб (с НДС)	Сумма, руб
1	Нитрат серебра	г	1	2500	2500
2	Боргидрид натрия	г	1	1000	1000
3	Вакцина Энцевир	ампула	2	2700	2700
4	Бычий сывороточный альбумин	г	0,5	2100	2100
5	Калия хлорид насыщенный	г	10	68	68
6	Кислота азотная	мл	10	200	200
7	Нитрат калия	г	15	246	246
8	Колбы мерные на 50 и 100 см ³	шт	10	120	1200
9	Цилиндры мерные с носиком на 25, 50, 100 см ³	шт	5	70	350
10	Пипетки, градуированные на 5, 10 см ³	шт	3	95	285
11	Стаканы на 25, 50, 100 см ³	шт	7	60	420
12	Пробирки	шт	3	20	60
13	Эппендорф 2 см ³	упаковка	250 шт	3	750
Итого:					11879

4.8.1 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры), необходимого для проведения работ по теме НИР. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам с учетом НДС. При приобретении спецоборудования учтены затраты по его

доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Расчет затрат представлен в таблице 4.10.

Таблица 4.10 – Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт.	Цена единицы оборудования, руб.	Общая стоимость оборудования, руб.
1	Дистиллятор для приготовления воды очищенной (Россия, ЧЗБТ)	1	35000	35000
2	Весы аналитические (класс точности 0,0001 г., Россия)	1	38000	38000
3	Дозатор 1-канальный, переменного объема 1-5 мл (Россия)	1	5780	5780
4	Дозатор 1-канальный, переменного объема 10-100 мкл (Россия)	1	7906	7906
5	Углеродсодержащий электрод с обновляемой поверхностью	3	790	2370
Итого:				89056

Стоимость оборудования, используемого при выполнении НИР, имеющегося на кафедре отделения химической инженерии стоимостью свыше 40 тыс. рублей, учитывалось в виде амортизационных отчислений. В данном случае выбран линейный способ амортизации оборудования, при котором происходит равномерное начисление амортизации с первоначальной до остаточной стоимости (в конце срока службы) в течение всего срока использования. Текущая остаточная стоимость определяется вычитанием суммарной накопленной амортизации основного средства из первоначальной стоимости.

Формула амортизации оборудования для определения ежемесячной суммы (М):

$$\Sigma M = ПС * n, \quad (3)$$

где ПС – первоначальная стоимость оборудования;

n – ежемесячная норма амортизации, рассчитываемая как отношение 1 к сроку полезного использования, выраженному в месяцах.

Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования» представлена в таблице 4.11.

Таблица 4.11 - Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	Цена оборудования, руб.	Эксплуатации оборудования, количество лет	Амортизация, руб.
Спектрофотометр универсальный Agilent Cary 60 (производство Германия).	650000	10	5416,45
Вольтамперометрический анализатор TA-Lab	230000	10	1916,59
Итого:			7333,04

4.8.2 Основная заработная плата исполнителей темы

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, рабочих макетных мастерских и опытных производств, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда). Статья включает основную заработную плату работников,

непосредственно занятым выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (4)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата;

$Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ($Z_{осн}$) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \times T_{раб}, \quad (5)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата одного работника;

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \times M}{F_d}, \quad (6)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 24 раб. дня $M = 11,2$ месяца, 5-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научнотехнического персонала, раб. дн. (табл. 4.12).

Таблица 4.12 Баланс рабочего времени за 2020 год

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней - выходные дни - праздничные дни	118	118
Потери рабочего времени - отпуск - невыходы по болезни	24	-

Продолжение таблицы 4.12

Действительный годовой фонд рабочего времени	223	247
--	-----	-----

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_b \times K_p, \quad (7)$$

где Z_b – базовый оклад, руб.;

K_p – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Основная заработная плата руководителя (от ТПУ) рассчитывается на основании отраслевой оплаты труда. Отраслевая система оплаты труда в ТПУ предполагает следующий состав заработной платы:

- 1) оклад – определяется предприятием. В ТПУ оклады распределены в соответствии с занимаемыми должностями. Базовый оклад Z_b определяется исходя из размеров окладов, определенных штатным расписанием предприятия.
- 2) стимулирующие выплаты – устанавливаются руководителем подразделений за эффективный труд, выполнение дополнительных обязанностей и т.д.
- 3) иные выплаты; районный коэффициент.

Найдем основную заработную плату за период с января по май 2020 года для руководителя:

$$Z_{\text{мес}} = 35120 \times 5 = 175600 \text{ руб.}$$

$$Z_{\text{осн}} = 175600 \times 1,3 = 228280 \text{ руб.}$$

Таблица 4.13 - Расчёт основной заработной платы с января по май

Исполнители	Z_b , руб.	K_p	$Z_{\text{мес}}$, руб.	$Z_{\text{осн}}$, руб.
Руководитель	35120	1,3	175600	228280
Инженер	26300	1,3	131500	170950
Итого:				399230

4.8.3 Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} * Z_{\text{осн}}, \quad (8)$$

где $K_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

Отчисления на социальные нужды составляет 30,2 % от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляют отчисления в пенсионный фонд 22 %, отчисление на социальное страхование 2,9%, отчисления на медицинское страхование 5,1 %, страхование от несчастного случая 0,5 %.

Таблица 4.14 - Отчисления на социальные нужды

	Руководитель	Инженер
Зарплата, руб.	175600	131500
Отчисления на соц. нужды, руб.	53031,2	39713

4.9 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

4.9.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Таблица 4.15 - Группа затрат по статьям аналогов разработки (на 9 месяцев)

В-т вып-я аналога	Сырье и материалы, руб.	Специальное оборудование, руб.	Амортизация, руб.	Основная зп, руб.	Отчисления на соц. нужды, руб.	Плановая себестоимость, руб.
1	25459	215460	210365	164138	36293,1	651 715,1
2	11879	89056	161400	164138	36293,1	462 766,1
Итого:						1 114 481,2

Анализ был проведен сравнительно с основным конкурентом производителем – 1, и соответственно текущим проектом-2.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^a = \frac{651715,1}{1114481,2} = 0,58 \quad (9)$$

$$I_{\phi}^p = \frac{462766,1}{1114481,2} = 0,42 \quad (10)$$

где I_{ϕ}^p - интегральный финансовый показатель разработки

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (11)$$

где I_m –

a_i - весовой коэффициент i -го параметра;

b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Таблица 4.16 - Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

ПО Критерий	Весовой коэффициент параметра	Вольтамперометрия	ИФА	ПЦР
1.Рост производства	0,1	4	5	4
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителя)	0,1	5	5	3
3. Цена (уменьшение себестоимости продукции)	0,2	4	4	3
4. Энергосбережение	0,2	4	3	4
5. Надежность	0,2	4	4	3
6. Материалоемкость	0,2	5	4	4
ИТОГО:	1			

$$I_m^p = 0,1 \times 4 + 0,1 \times 5 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 5 = 4,3$$

$$I_m^b = 0,1 \times 5 + 0,1 \times 5 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 3 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 4 = 4,0$$

$$I_m^{bt} = 0,1 \times 4 + 0,1 \times 3 + 0,2 \times 3 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 3 + 0,2 \times 4 = 3,5$$

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{\text{финр}}^p$) и аналога ($I_{\text{финр}}^a$) определяли на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{\text{финр}}^a = \frac{I_m^a}{I_{\phi}^a} = \frac{4,0}{0,56} = 7,14 \quad (12)$$

$$I_{\text{финр}}^p = \frac{I_m^p}{I_{\phi}^p} = \frac{4,5}{0,42} = 10,24 \quad (13)$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта.

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{финр}}^p}{I_{\text{финр}}^a} = \frac{10,24}{7,14} = 1,43 \quad (14)$$

где $\mathcal{E}_{\text{ср}}$ – сравнительная эффективность проекта;

$I_{\text{тэ}}^p$ – интегральный показатель разработки;

$I_{\text{тэ}}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Можно сделать вывод, что реализация проекта в первом исполнении является более эффективным вариантом с позиции ресурсосбережения.

Выводы по главе

В рамках данного раздела ВКР была проведена оценка конкурентоспособности по разработке электрохимического иммуносенсора для определения антигена вируса клещевого энцефалита в организме человека по сравнению с аналогами, рассчитан показатель, оценивающий перспективность данной разработки, который определяет уровень перспективности как «выше среднего». Был составлен перечень этапов работ и определена их трудоемкость, построен календарный план-график выполнения работ. Рассчитан

ориентировочный бюджет на создание научной разработки, а также проведена оценка эффективности научного исследования с позиции ресурсосбережения.

Глава 5 Социальная ответственность

Введение

В настоящем разделе рассматриваются вопросы охраны труда, связанные с работой в лаборатории, а также разрабатываются мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье опасных и вредных факторов для работников лаборатории и создание безопасных условий труда для обслуживающего персонала. Научно-исследовательская работа по разработке электрохимического иммуносенсора для определения антигена ВКЭ выполнялась с использованием электрооборудования, и применением химических реактивов в учебной лаборатории второго корпуса НИ ТПУ.

Потенциальными потребителями результатов исследования могут быть различные медицинские учреждения, проводящие анализы крови, а также фармацевтические компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей.

В Федеральном законе РФ от 28 декабря 2013 г. N 426-ФЗ "О специальной оценке условий труда" Статья 3. Специальная оценка условий труда говорится, что необходимо выявить все вредные и опасные факторы для оценки их влияния на работника. Выполнение научно-исследовательской работы по данной тематике требует четкого соблюдения правил по технике безопасности и охраны труда работников: при работе с химическими реактивами; едкими и ядовитыми веществами, при работе с электрооборудованием и т.п.

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

На производстве необходимо следовать требованиям ТК РФ. Согласно Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 апреля 2011 г (ред. от 13.12.2019), необходимо проводить обязательные предварительные (при поступлении на работу) и периодические

медицинские осмотры (обследования) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда [50].

В ходе проведения исследований необходимо соблюдать технику безопасности, во избежание несчастных случаев. Чтобы избежать воздействия опасных и вредных факторов, необходимы организационные, профилактические мероприятия. Без ознакомления с инструкцией по технике безопасности перед выполнением НИР работа в лаборатории запрещена. При работе в лаборатории согласно Техническому Регламенту «О безопасности средств индивидуальной защиты», сотрудники и студенты должны иметь специальную одежду: халат, обувь, а также при необходимости средства индивидуальной защиты (очки, перчатки) [51].

Во избежание несчастных случаев следует проводить обучение и проверять знания работников согласно ГОСТ 12.0.004-2015. «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения».

Нормативную базу требований к системе обращения с медицинскими отходами составляют следующие основные документы:

- Федеральный закон РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» № 323-ФЗ от 21.11.2011 года;
- Постановление Правительства РФ «Об утверждении критериев разделения медицинских отходов на классы по степени их эпидемиологической, токсикологической, радиационной опасности, а также негативного воздействия на среду обитания» № 681 от 04.07.2012 года;
- Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами СанПиН 2.1.2790-10, утвержденные Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 163 от 09.12.2010 года.

В силу прямого указания пункта 3 статьи 49 Федерального закона РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и пункта 2 статьи 2 Федерального закона Российской Федерации «Об отходах производства и

потребления» № 89-ФЗ от 24.06.1998 года (с изм. на 25.11.2013 года) сбор, использование, обезвреживание, размещение, хранение, транспортировка, учет и утилизация медицинских отходов осуществляются в порядке, установленном законодательством в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Действие нормативных правовых актов Министерства природных ресурсов и экологии России в области обращения с отходами не распространяются на медицинские отходы (Письмо Министерства природных ресурсов и экологии РФ «О регулировании природоохранной деятельности с медицинскими отходами» № 05-12-44/832 от 25.01.2012).

Руководителям организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, должна быть утверждена инструкция, в которой определены ответственные сотрудники и процедура обращения с медицинскими отходами в данной организации. Процедура обращения с отходами, описанная в инструкции должна содержать информацию по всем этапам системы обращения с отходами.

5.1.1 Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства

Согласно ст. 219 Трудового кодекса Российской Федерации (ТК РФ) работник имеет право на компенсации, установленные в соответствии с Трудовым кодексом, коллективным договором, соглашением, локальным нормативным актом, трудовым договором, если он занят на тяжелых работах, работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

Ниже представлены компенсации, на которые имеют право работники.

1. Оплата труда работников, занятых на тяжелых работах, работах с вредными и (или) опасными и иными особыми условиями труда, устанавливается в повышенном размере по сравнению с тарифными ставками, окладами (должностными окладами), предусмотренными в

- отношении различных видов работ с нормальными условиями труда (ст. 147 ТК РФ).
2. Продолжительность рабочего времени работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, не может превышать 36 часов в неделю (ст. 92 ТК РФ).
 3. Работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда (на подземных горных работах и открытых горных работах в разрезах и карьерах, в зонах радиоактивного заражения, на других работах, связанных с неблагоприятным воздействием на здоровье человека вредных физических, химических, биологических и иных факторов) предоставляется ежегодный дополнительный оплачиваемый отпуск (ст. 117 ТК РФ).
 4. Работники, занятые на тяжелых работах и работах с вредными и (или) опасными условиями труда (в т. ч. на подземных работах), а также на работах, связанных с движением транспорта, должны проходить обязательные предварительные (при поступлении на работу) и периодические медицинские осмотры (ст. 213 ТК РФ).
 5. На работах с вредными и (или) опасными условиями труда, а также на работах, выполняемых в особых температурных условиях или связанных с загрязнением, работникам бесплатно выдаются сертифицированные специальная одежда, специальная обувь и другие средства индивидуальной защиты (СИЗ), а также смывающие и (или) обезвреживающие средства в соответствии с типовыми нормами (ст. 221 ТК РФ).
 6. На работах с вредными условиями труда работникам выдаются бесплатно по установленным нормам молоко или другие равноценные пищевые продукты. Их выдача работникам по письменным заявлениям последних может быть заменена компенсационной выплатой в размере, эквивалентном стоимости молока или других равноценных пищевых продуктов, если это предусмотрено коллективным договором и (или)

трудовым договором. На работах с особо вредными условиями труда работникам предоставляется бесплатно по установленным нормам лечебно-профилактическое питание (ст. 222 ТК РФ).

7. В соответствии с пенсионным законодательством работники, проработавшие в особых условиях определенный период времени, пользуются правом на досрочный выход на пенсию по возрасту (ст. 27, 28 Федерального закона от 17.12.2001 № 173-ФЗ «О трудовых пенсиях в Российской Федерации»).

5.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

Эргономическое проектирование рабочих пространств и рабочих мест производится для конкретных рабочих задач и видов деятельности с учетом антропометрических, биомеханических, психофизиологических и психических возможностей и особенностей работающих людей. Оно должно создать наилучшие условия для:

- размещения работающего человека с учетом рабочих движений и перемещений в соответствии с требованиями технологического процесса;
- выполнение основных и вспомогательных операций в удобном рабочем положении, соответствующем специфике трудового процесса, и с применением наиболее эффективных приемов труда;
- расположение средств управления в пределах оптимальных границ пространства перемещений человека;
- сохранения оптимального обзора источников визуальной информации при смене рабочей позы и рабочего положения;
- рационального размещения оборудования, безопасности рабочих.

Правильное расположение и компоновка рабочего места, обеспечение удобной позы и свободы трудовых движений, использование оборудования, отвечающего требованиям эргономики и инженерной психологии, обеспечивают

наиболее эффективный трудовой процесс, уменьшают и предотвращают опасность возникновения профессиональных заболеваний.

Неправильное положение тела на рабочем месте приводит к быстрому возникновению статической усталости, снижению качества и скорости выполняемой работы, а также снижению реакции на опасности.

В результате анализа условий труда при работе в химической лаборатории можно сделать вывод, что выполнение научно-исследовательской работы требует четкого соблюдения правил техники безопасности.

5.2 Производственная безопасность

Опасные и вредные факторы при работе по получению и исследованию биоконъюгатов на основе наночастиц серебра представлены в таблице 1.

Таблица 5.1 - Возможные опасные и вредные факторы

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этапы работ			Нормативная документация
	Подготовка к исследованию	Исследование	Обработка результатов	
Работа с вредными химическими веществами	+	+		- ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1) - ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2)
Отклонение показателей микроклимата	+	+	+	СанПиН 2.2.4.548-96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений
Превышение уровня шума		+	+	ГОСТ 12.1.003-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности (с Изменением N 1)
Недостаточная освещенность рабочей зоны	+		+	СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95

Продолжение таблицы 5.1.

Электробезопасность	+	+	+	ГОСТ Р 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
---------------------	---	---	---	---

5.2.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследования и обоснование мероприятий по их устранению

5.2.1.1 Работа с вредными химическими веществами

Работа в аналитической лаборатории требует соблюдения техники безопасности, охраны труда работников, индивидуальной защиты [51]. Условия труда должны быть максимально безвредными. Научно-исследовательская работа по теме: «Разработка электрохимического иммуносенсора для определения антигена ВКЭ» связана с химическими реактивами и электроприборами.

Используются вредные и опасные химические вещества, при несоблюдении мер безопасности они могут причинить вред здоровью и угрозу жизни [52]. В аналитической лаборатории химик – аналитик подвергается физическим факторам: параметры микроклимата (температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха), параметры световой среды (искусственное освещение (освещенность) рабочей поверхности). При нарушении санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории на работников могут воздействовать неблагоприятные факторы производственной среды. Основными из них являются, прежде всего, контакт с токсичными химическими веществами, значительное напряжение зрения при выполнении анализов, работа с приборами и взвешивание на аналитических весах.

Характеристика химических веществ, используемых при выполнении НИР, согласно ГН 2.2.5.1313-03, представлена в таблице 2. Минимизировать возможный незначительный риск для здоровья в процессе выполнения работы и снизить содержание реактивов в воздухе рабочей зоны позволили следующие мероприятия:

1. Использование средств индивидуальной защиты (очки, щитки, маски, респираторы, резиновые перчатки, спецодежда).
2. Герметизация тары хранения и оборудования для проведения реакции.
3. Вытяжная система вентиляции (вытяжной шкаф).

Таблица 5.2 – Характеристика химических веществ

	Наименование	Физические свойства	Величина ПДК, мг/м ³	Класс опасности	Токсическое действие
1	Конц. аммиак	Бесцветная жидкость с резким запахом нашатыря	20	4	Вызывает раздражение слизистых оболочек и кожных покровов
2	Конц. азотная кислота	Бесцветная, дымящая на воздухе жидкость	2	3	Пары вызывают раздражение дыхательных путей
3	Конц. уксусная кислота	Бесцветная жидкость с характерным резким запахом и кислым вкусом	5	3	Пары уксусной кислоты раздражают слизистые оболочки верхних дыхательных путей

5.2.1.2 Отклонение показателей микроклимата

Показателями метеорологических условий производственной среды согласно ГОСТ 12.1.005 – 89 являются температура, относительная влажность и скорость движения воздуха. Негативные значения показателей микроклимата становятся причиной уменьшения производственных показателей в работе, простуды, радикулита, хронического бронхита и многих других заболеваний. Устанавливаются оптимальные и допустимые значения этих параметров с учетом избытка теплоты, тяжести выполнения работ и сезонов года. В таблице 3

представлены нормы показателей метеорологических условий в рабочей зоне, которые соблюдаются в данной лаборатории.

В соответствии с СанПиНом 2.2.4.548–96, работа в лаборатории, выполняемая в положении стоя или сидя, и требующая определенного физического напряжения, связанная с постоянной ходьбой, перемещение мелких (до 1 кг) изделий или предметов относится к физической работе (категория Па) [53].

Таблица 5.3 – Допустимые нормы микроклимата

Сезон года	Категория тяжести выполняемых работ	Температура, °С		Относительная влажность, %		Скорость движения, м/с	
		Фактич.	Доп.	Фактич.	Доп.	Фактич.	Доп.
Холодный	Па	18	19-21	50-40	60-40	0,2	0,2
Теплый	Па	20	20-22	50-40	60-40	0,2	0,2

К средствам коллективной защиты можно отнести установки кондиционирования воздуха, основная задача которых поддерживать параметры воздуха в установленных пределах, для обеспечения надежной работы и комфортных условий для работников.

В лаборатории необходимо создать приток свежего воздуха. Воздух, который используется для вентиляции лаборатории, должен быть очищен от пыли. Для обеспечения допустимых норм микроклимата в рабочей зоне необходимо установить в холодный период времени отопительную систему. Помещение, где находится рабочее место, должно соответствовать нормам, количеству размещенного в нем оборудования и размерам (объем, площадь) по количеству рабочих мест. Нормальные условия труда согласно СанПиН 2.2.4.548 – 96 (Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений) устанавливает, что на одно рабочее место должно отводиться не менее 4,5 м²

площади в помещении и 20 м^3 воздуха. Площадь данного помещения составляет 30 м^2 , объем 100 м^3 . В данном помещении работают 4 человека, соответственно на одного человека приходится $6,6 \text{ м}^2$ и 25 м^3 воздуха. Это соответствует санитарным нормам.

5.2.1.3 Превышение уровня шума

Шум является одним из наиболее распространенных вредных факторов на производстве, он крайне негативно влияет на здоровье человека. Длительное воздействие шума вызывает ухудшение слуха, реже приводит к глухоте, но также уменьшается внимание и увеличивается расход энергии человеком при выполнении какого-либо вида работ. Для рабочего места характерно наличие шумов: установки кондиционирования создают аэродинамический шум, преобразователи напряжения – электрический [54].

Уровни шума не должны превышать значений, установленных в ГОСТ 12.1.003 – 83 (с изм. на 10.12.2018) и ГОСТ 17187 – 81 (СТ СЭВ 1351-78) (с Изменением N 1) и проводится не реже двух раз в год. По СН 2.2.4/2.1.8.562-96 нормируются параметры шума и составляют: для лаборатории ПДУ 75 - Дб; для вентиляции ПДУ - 70 Дб. По уровню шума, локальной и общей вибрации данная лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ <25 дБА, что соответствует требованию безопасного нахождения в лаборатории установленного в этом стандарте. Контроль шума осуществляется шумером. Для снижения шума в лабораториях используется шумобезопасная техника, звукоизоляция, звукопоглощение, рациональная планировка помещения и т.д.

5.2.1.4 Освещенность рабочей зоны

Источник естественного освещения – поток энергии солнца. Естественное освещение является наиболее гигиеничным. Однако по условиям зрительной

работы в лаборатории естественного освещения, как правило, недостаточно, поэтому на рабочих местах оказывается задействованным и искусственное освещение [55]. Оно может быть обеспечено с помощью люминесцентных ламп ЛВ (белого цвета) мощностью 20, 40, 80 Вт. Для рабочих мест с искусственным освещением регламентирована допустимая освещенность, согласно действующим санитарным нормам и правилам СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03.

Согласно СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03, лаборатория, в которой проводятся работы, относится к I группе помещений по задачам зрительной работы, в которых производится различение объектов зрительной работы, при фиксированном направлении линии зрения работающих на рабочую поверхность, а именно взвешивание малых количеств веществ (стандарта холестерина) [56]. В таблице 4 приведены нормы искусственного освещения.

Таблица 5.4 – Нормы искусственного освещения

Характеристика зрительной работы	Разряд зрительной работы	Искусственное освещение	
		Освещенность, лк	
		При комбинир. освещении	При общем освещении
Наивысшей точности	I	500	400

При выборе осветительного оборудования необходимо учесть условия среды, светотехнические требования и экономические показатели. Контроль искусственного и естественного освещения производственных помещений необходимо проводить не реже одного раза в год при помощи люксметра [57].

5.2.1.5 Электробезопасность

По действующим правилам устройства электроустановок (ПУЭ) лабораторное помещение относится к первому классу, т.е. помещениям без повышенной опасности. Тем не менее, необходимо знать о причинах

воздействия электрического тока, и мероприятиях, проводимых для их устранения.

Основной причиной воздействия электрического тока на организм человека являются: напряжение, возникнувшее в результате повреждения изоляции на металлических частях оборудования. Наибольшую опасность при эксплуатации электрических устройств и проведении ремонтно-профилактических работ представляет поражение электрическим током вследствие присоединения к токоведущим частям аппаратуры и к частям прибора, находящимся под напряжением. Поражающее воздействие электрического тока напрямую зависит от длительности и значения протекания электрического тока через организм человека, частоты и рода тока, места прохождения через тело человека, индивидуального состояния человека. Наибольшую опасность для организма человека представляет переменный ток с частотой от 20 до 100 Гц.

Мероприятия, проводимые для устранения факторов поражения электрическим током:

- а) все лица, приступающие к работе с электрооборудованием, проходят инструктаж на рабочем месте, допуск к самостоятельной работе разрешается лишь после проверки знаний техники безопасности;
- б) осуществляется постоянный контроль качества и исправности защитных приспособлений и заземлении, ремонтно-наладочные работы на действующих электроустановках производится только с использованием защитных средств;
- в) эксплуатация электроустановок предусматривает введение необходимой технической документации; обеспечивается недоступность к токоведущим частям, находящимся под напряжением; корпуса приборов и электроустановок заземляются.

Установление предельно допустимых уровней (ПДУ) напряжения и тока согласно ГОСТ 12.1.038 – 82 (с изм. N 1). Защитные мероприятия от поражений электрическим током – защитное заземление ГОСТ 12.1.030-81 (с изм. N 1). Принцип действия защитного заземления: человек должен стоять внутри

контура заземления и при попадании фазного напряжения на заземленный корпус прибора, под фазным напряжением окажется как корпус прибора, так и участок земли, на которой стоит человек.

5.3 Экологическая безопасность

Вредные вещества могут попадать в окружающую среду по сточным водам в виде пыли, дыма, газа, твердых отходов производства, поэтому охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов имеет огромное экономическое и социальное значение.

5.3.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду

Аналитическая деятельность по получению и исследованию конъюгатов на основе НЧ серебра не связана с выбросом вредных веществ, следовательно, выбросов в атмосферу и литосферу нет. Что касается сбросов в гидросферу, то канализационные стоки от деятельности сбрасываются в общегородскую канализацию. Предварительно концентрацию НЧ серебра уменьшают путем разбавления раствора до нейтральной среды (рН 5,5), объемы растворов незначительны.

5.3.2 Мероприятия по защите окружающей среды

В случае поломки основного оборудования лаборатории – электроприборов, оргтехники и т.д, не подлежащей ремонту, их должны рационально складировать и провести захоронение отходов, обезвреживание и их утилизацию.

Для случая люминесцентных ламп, необходимо заключить договор с фирмой, занимающейся их утилизацией, чтобы своевременно поставлять

вышедшие из строя или перегоревшие лампы, с целью уменьшения вреда окружающей среды из-за наличия в лампах такого опасного вещества, как ртуть.

В настоящее время в нашей стране уделяется большое внимание организации разумного взаимодействия природы и общества. Комплексное использование сырья прогрессивно с точки зрения экономики и охраны окружающей среды разработаны безотходные технологии, позволяющие вернуть отходы вновь в производство.

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

5.4.1 Анализ вероятных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований

При выполнении ВКР может возникнуть чрезвычайная ситуация - замыкание проводки и возгорание. По возможности, пламя необходимо потушить песком, но перед этим необходимо сообщить руководителю. Соблюдая все правила с электрическим оборудованием можно избежать ЧС.

5.4.2 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС

Все лабораторные помещения должны соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004-91 (с изм. N 1) и иметь необходимые средства противопожарной безопасности согласно ГОСТ 12.4.009-83 (с изм. N 1). Помещения лабораторий по степени пожароопасности относятся к классу П-2, так как в нем присутствует выделение пыли и волокон во взвешенном состоянии (в ред. Федерального закона от 10.07.2012 N 117-ФЗ).

Лаборатории должны быть оснащены пожарными кранами (в количестве не менее одного на этаж) с пожарными рукавами необходимой длины. Каждое рабочее помещение должно быть оснащено песком и огнетушителями, а

помещения с легковоспламеняющимися и огнеопасными веществами - дополнительными средствами пожаротушения. На видном месте в помещении лаборатории должен висеть план эвакуации. Необходимо назначить из числа сотрудников группу (2 - 5 человек), которая сможет организовать мероприятие противопожарной безопасности, получив предварительно инструктаж от местной команды пожарных.

Каждый сотрудник лаборатории должны быть ознакомлен с правилами обращения с взрыво- и огнеопасными веществами, газовыми приборами, а также использовать противогаз, огнетушитель и другие средства пожаротушения, имеющимися в наличие лаборатории. В лаборатории, а также в непосредственной близости от них (под лестницами, в коридорах) строго запрещается хранение горючих материалов, и установление предметов, загромождающих пути эвакуации и доступа к средствам пожаротушения. Курение разрешается только в специально отведенных и оборудованных зонах. Курение в лаборатории воспрещается. Отсутствие разрешения начальника или сотрудника, отвечающего за противопожарную безопасность, запрещается установление нагревательных и лабораторных приборов, запуск в эксплуатацию. Нагревательные приборы необходимо установить на термостойкую подставку. Строго запрещена эксплуатация неисправных нагревательных и лабораторных приборов. Сотрудник лаборатории, заметивший задымление, пожар или другие признаки пожара обязан:

- незамедлительно сообщить в пожарную часть по телефону;
- принять всевозможные меры по недопущению распространения огня;
- известить начальника лаборатории, который в свою очередь обязан известить сотрудников, принять меры по ликвидации пожара и их эвакуации. – знать и уметь пользоваться первичными средствами пожаротушения.

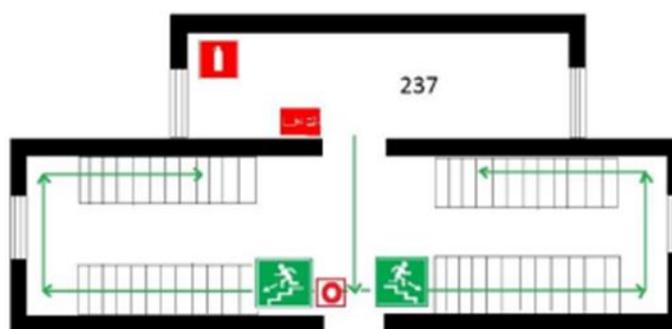


Рисунок 5.1 – План эвакуации при пожаре

Для тушения пожаров, в случае их возникновения, в лаборатории имеются следующие средства:

- асбестовое одеяло, которое используется при тушении обесточенных электропроводов, горячей одежды;
- ящик с песком для тушения обесточенных горящих на горизонтальной поверхности проводов;
- огнетушитель ОХП-10, предназначенный для тушения пожаров твердых горючих материалов, легковоспламеняющихся и горючих жидкостей;
- огнетушитель ОВП-10, предназначенный для тушения различных веществ и материалов, за исключением щелочных металлов и веществ, горение которых происходит без доступа воздуха, а также электроустановок, находящихся под напряжением [58].

В лаборатории имеются огнетушители марки ОХП-10 и ОВП-10, которые предназначены для тушения загорания различных веществ и материалов, за исключением щелочноземельных элементов, а также электроустановок под напряжением до 1000 В. При загорании снять огнетушитель, поднести к очагу загорания (не менее 1 метра), прочистить спрыск иглой или гвоздем, повернуть рычаг до отказа до 180°, перевернуть огнетушитель вверх дном и направить струю на огонь. Действие огнетушителя 60 секунд, длина струи пены 6-8 метров. Выход пены из огнетушителя 50 литров.

Выводы по главе

Данное исследование предполагает работу с вредными химическими веществами (концентрированные кислоты). Полученные результаты раздела «Социальная ответственность» содержат в себе основные рекомендации и указания, которые следует выполнять при разработке электрохимического иммуносенсора и исследовании конъюгатов на основе НЧ серебра – антитело.

На основании данных исследований были проанализированы вредные и опасные производственные факторы, влияющие на лаборантов в процессе их работы, такие как, воздействие вредных и опасных химических реагентов, отклонение от микроклимата, неправильное освещение рабочего места, производственные шумы, возможность поражения электрическим током, а также следствие влияния этих факторов на работающего в виде переутомляемости или профессиональных заболеваний. С учетом этого приведены рекомендации по организации рабочего места лаборанта, позволяющие повысить производительность труда и свести к минимуму вероятность профессиональных заболеваний.

К химическим факторам воздействия относятся такие реагенты как:

- концентрированный аммиак;
- концентрированная азотная кислота;
- концентрированная уксусная кислота;

В соответствии с их свойствами были присвоены классы опасности данных реагентов, соответственно 4,3,3. Для защиты от вредного воздействия данных химических реагентов были выбраны средства индивидуальной защиты.

По уровню шума, локальной и общей вибрации данная лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ <25 дБА, что соответствует требованию безопасного нахождения в лаборатории установленного в этом стандарте.

Были исследованы возможные ЧС в лаборатории, а именно пожар и способы его устранения и предотвращения.

Заключение

По результатам проведенного исследования

- 1) Получены НЧ серебра сферической формы со средним размером 14 – 16 нм, путем химического восстановления нитрата серебра боргидридом натрия.
- 2) Методом пассивной адсорбции получены конъюгаты на основе антивидовых моноклональных антител против ВКЭ с меткой НЧ серебра. Было выявлено, что на синтез конъюгатов влияет соотношение антител (1600 ед/мл) к НЧ серебра, которое в нашем случае составило 18:1.
- 3) Конъюгаты были охарактеризованы инструментальными методами анализа.
- 4) Эффективным растворителем конъюгата $Ab@Ag$ является смесь уксусной и азотной кислот. Рабочими вольтамперометрическими условиями регистрации сигнала от серебра конъюгатов являются: метод анодной инверсионной вольтамперометрии с $E_{нак} = \text{минус } 0,600 \text{ В}$; $t_{нак} = 80 \text{ с}$, скорость развертки 40 мВ/с; фоновый электролит: $KNO_3 \text{ } 0,040 \text{ М} + HNO_3 \text{ } 0,15 \text{ М}$.
- 5) Разработан модельный электрохимический иммуносенсор для определения антигена ВКЭ.
- 6) Электрохимический иммуносенсор для определения антигена ВКЭ апробирован на вакцине ЭнцеВир.

Список публикаций

1. XX Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва. Раздел: Теоретические и прикладные аспекты физической и аналитической химии.
Тезис на тему «Подбор стабилизаторов для наночастиц серебра, применяемых в качестве меток для электрохимических сенсоров».
2. XXI Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва. Раздел: Теоретические и прикладные аспекты физической и аналитической химии.
Тезис на тему «Определение антигена вируса клещевого энцефалита методом вольтамперометрии» (печать).

Список используемых источников

1. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives / Quang Huy Tran, Van Quy Nguyen and Anh-Tuan Le // *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* - 2013. – Vol. 4, №3. – 20 p.
2. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection / Mahendra Rai, Shivaji D. Deshmukh, Avinash P. Ingle, Indarchand R. Gupta, Massimiliano Galdiero, Stefania Galdiero // *Crit Rev Microbiol.* – 2014. – Vol. 42, №1. – P. 46-56.
3. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology / Yi-Cheun Yeh, Brian Creran and Vincent M. Rotello // *Nanoscale.* – 2012. – Vol. 4. – P. 1871-1880.
4. Preparation and quality control of silver nanoparticle–antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays / Mateusz S. Szymanski, Robert A. Porter // *Journal of Immunological Methods.* – 2012. – P. 262–269.
5. Greg T. Hermanson / *Bioconjugate Techniques* Second edition // Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA. – 2008. – P. 582-617.
6. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene / Butler J.E., Ni L., Nessler R., Joshi K.S., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W.R., and Cantarero L.A. // (1992). *J. Immunol. Meth.* – 1992. – P. 77-90.
7. Butler J.E. / Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays // *Methods.* – 2000. – Vol. 22, P. 4-23.
8. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays / Cantarero L.A., Butler J.E., and Osborne J.W. // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 105, P. 375-382.
9. Adsorption-induced antigenic changes and their significance in ELISA and immunological disorders / Butler J.E., Navarro P., and Sun J. // *Immunol Invest.* – 1997. – Vol. 26, P. 39-54.

10. Preparation and quality control of silver nanoparticle–antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays / Mateusz S. Szymanski, Robert A. Porter // *Journal of Immunological Methods*. – 2013. – Vol. 387, P. 262-269.
11. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology / Yeh Y., Creran B., Rotello V. // *Nanoscale*. – 2012. – Vol. 4, P. 1871-1880.
12. Overview of the main methods used to combine proteins with nanosystems: absorption, bioconjugation, and encapsulation / Marco M. Di., Razak K.A., Aziz AA, et al. // *Int J Nanomedicine*. – 2010. – P. 37-49.
13. Albumin-CdTe Nanoparticle Bioconjugates: Preparation, Structure, and Interunit Energy Transfer with Antenna Effect / Nataliya N. Mamedova and Nicholas A. Kotov // *Nano Letters*. – 2001. – Vol. 1, № 6, P. 281-286.
14. A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles / Haes A J, Van Duyne R P. // *J Am Chem Soc*. – 2002. – Vol. 124, P. 10596-10604.
15. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface / Nath N, Chilkoti A. // *Anal Chem*. – 2002. – Vol. 74, P. 504-509.
16. Attachment of monoclonal antibodies to microspheres / Illum L., and Jones P.D.E. // *Academic Press, Inc*. – 1985. – Vol. 112, P. 67-84.
17. Hala K Farag / Sonochemical synthesis of silver nanoparticles in the ionic liquid 1-ethyl-3 methylimidazoliumtrifluoromethylsulfonate // *Journal of Pure and Applied Sciences*. – 2015. – Vol. 9, №2, P. 3455-3460.
18. Interfacial Bioelectrochemistry: Fabrication, Properties and Applications of Functional Nanostructured Biointerfaces / Da Chen, Geng Wang, and Jinghong Li // *J. Phys. Chem*. – 2007. – Vol. 111, P. 2351-2367.
19. Preparation and quality control of silver nanoparticle–antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays / Mateusz S. Szymanski, Robert A. Porter // *Journal of Immunological Methods*. – 2013. – Vol. 387, P. 262-269.

20. Подбор стабилизаторов для наночастиц серебра, применяемых в качестве меток для электрохимических сенсоров / П. Г. Шевелева, Е. Христунова, Е. В. Дорожко; // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых. – Томск: Изд-во ТПУ, 2019. - С. 291-292.
21. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas* / Harekrishna Bar, Dipak Kr. Bhui, Gobinda P. Sahoo, Priyanka Sarkar, Sankar P. De, Ajay Misra // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* – 2009. – Vol. 339, P. 134-139.
22. Electrical transport studies of Ag nanoparticles embedded in glass matrix / P. Magudapatty, P. Gangopadhyayans, B.K. Panigrahi, K.G.M.Nair, S. Dhara // *Physica B: Condensed Matter.* – 2001. – Vol. 299, P. 142-146.
23. Quasi-spherical silver nanoparticles with high dispersity and uniform sizes: preparation, characterization and bioactivity in their interaction with bovine serum albumin / Shan Jiang, Hua-Zuo Liu, Wan-Lin Cai, Ai-min Bai, Yu Ouyang and Yan-Jun Hu // *J. Luminescence.* – 2016. – Vol. 31, № 5, P. 1146-1151.
24. Bovine serum albumin interacts with silver nanoparticles with a «side-on» or «end on» conformation / Dasgupta, N., Ranjan, S., Patra, D., Srivastava, P., Kumar, A., Ramalingam, C. // *Chemico-Biological Interactions.* – 2016. – Vol. 253, P. 100-111.
25. Characterization of Silver/Bovine Serum Albumin (Ag/BSA) nanoparticles structure: Morphological, compositional, and interaction studies / A. Gebregeorgis, C. Bhan, O. Wilson, D. Raghavan // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2013. – Vol. 389, P. 31-41.
26. Interaction of Silver Nanoparticles with Serum Proteins Affects Their Antimicrobial Activity in Vivo / Divya Prakash Gnanadhas, Midhun Ben Thomas, Rony Thomas, Ashok M. Raichur, Dipshikha Chakravorttya //

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – Vol. 57, № 10, P. 4945–4955.
27. An electrochemical immunosensing method based on silver nanoparticles / Nan Hao, Hui Li, Yitao long, Lei Zhang, Xirui Zhao, Danke Xu, Hong-Yuan Chen // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2011. – P. 50-54.
28. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro / Teodora Miclaș, Christiane Beer, Jacques Chevallier, Carsten Scavenius, Vladimir E. Bochenkov, Jan J. Enghild, Duncan S. Sutherland // *Nature communications*. – 2016. – Vol. 7, P. 1-10.
29. Electrochemical biosensors / Niina J. Ronkainen, H. Brian Halsall, William R. Heineman // *J. Chemical Society Reviews*. – 2010. – Vol. 39, №5, P. 1747-1763.
30. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review / Xiaomei Pei, Bing Zhang, Juan Tang, Bingqian Liu, Wenqiang Lai, Dianping Tang // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 758, P. 1-18.
31. Electrochemical Biosensors as Potential Diagnostic Devices for Autoimmune Diseases / Anca Florea, Gheorghe Melinte, Ioan Simon and Cecilia Cristea // *J. Biosensors*. – 2019. – Vol. 9, № 1, P. 1-15.
32. A highly sensitive gold nanoparticle bioprobe based electrochemical immunosensor using screen printed graphene biochip / Lim, S.A.; Yoshikawa, H.; Tamiya, E.; Yasin, H.M.; Ahmed, M.U // *J. RSC Advances*. – 2014. – Vol. 4, № 102, P. 58460–58466.
33. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors / José M Pingarrón, Paloma Yanez-Sedeno, Araceli González-Cortés // *Electrochimica Acta*. – 2008. – Vol. 53, № 19, P. 5848-5866.
34. Wilhelm R. Glomm / Functionalized Gold Nanoparticles for Applications in Bionanotechnology // *Journal of Dispersion Science and Technology*. – 2005. – Vol. 26, № 3, P. 389-414.

35. An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label / Murielle Dequaire, Chantal Degrand, Benoît Limoges // Analytical chemistry. – 2000. – Vol. 72, № 22, P. 5521-5528.
36. Electrochemical Dissolution of Silver Nanoparticles and Its Application in Metalloimmunoassay / Mateusz Szymanski, Anthony P. F, Turner Robert Porter // J. Electroanalysis. – 2010. – Vol. 22, № 2, P. 191-198.
37. Electrochemical detection of silver ions by using sulfur quantum dots modified gold electrode / Li Fu, Aiwu Wang, Kefeng Xie, Jiangwei Zhu, Fei Chen, Henggang Wang, Huaiwei Zhang, et al // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2020. – Vol. 304, № 127390, P. 1-7.
38. An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label / Hong Cai, Ying Xu, Ningning Zhu, Pingang He, Yuzhi Fang // Analyst. – 2002. Vol. 127, № 6, P. 803-808.
39. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles / W Sally D. Solomon, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan et al. // Journal of Chemical Education. – 2007. – Vol. 84, № 2, P. 322-328.
40. Steven D. Schwartzbach, Tetsuaki Osafune / Immunoelectron Microscopy. Methods and Protocols // Humana Press, Totowa, NJ. – 2010. P. 109-119.
41. Фармакопейная статья вакцина для профилактики гепатита А. ФС 42-культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая / <https://gigabaza.ru/doc/31713.html> доступ свободный, дата обращения 5.03.2020.
42. A Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications / Zewde, A Ambaye, J. Stubbs III, D Raghavan // JSM Nanotechnology and Nanomedicine. – 2016. – Vol. 4, №2, P. 1-14.
43. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions / El Badawy A, Luxton T, Silva R, Scheckel K, Suidan M, Tolaymat T, et al // Environ. Sci. Technol. – 2010. Vol. 44, P. 1260-1266.

44. Electrochemical tracking hydrogen peroxide secretion in live cells based on autocatalytic oxidation reaction of silver nanoparticles / Peng Miao, Bidou Wang, Jian Yin, Xifeng Chen, Yuguo Tang // *Electrochemistry Communications*. – 2015. Vol. 53, P. 37-40.
45. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles / Sintubin L, De Windt W, Dick J, Mast J, Van der Ha, D, Verstraete W. // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2009. – Vol. 84, P. 741-749.
46. Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core-doxorubicin loading and delivery / Qi J, Yao P, He F, Yu C, Huang C. // *Int J Pharm*. – 2010. – Vol. 393, P. 176-184.
47. A SPR and AFM study of the effect of surface heterogeneity on adsorption of proteins / Huang YW, Gupta VK. // *J Chem Phys*. – 2004. – Vol. 121, P. 2264-2271.
48. Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: Impact and implications in biocorona formation / A. Sasidharana, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2015. – Vol. 3, №10, P. 2075-2082.
49. Получение и оценка чувствительности серебряных иммунозоль при постановке иммуноанализа в микротитровальных планшетах / А.Г. Полтавченко, И.А. Лавриенко, В.Г. Костровский, Д.А. Полтавченко, Т.Ю. Загоскина // *Сибирь-Восток*. – 2002. – № 12, С. 14-17.
50. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 13.12.2019).
51. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009.
52. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
53. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.

54. СН 2.2.4/2.1.8.562–96. Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории застройки.
55. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95.
56. Строительные нормы и правила СНиП 23-05-95. Естественное и искусственное освещение (утв. постановлением Минстроя РФ от 2 августа 1995 г. N 18-78) (с изменениями от 29 мая 2003 г.).
57. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий.
58. ГОСТ Р 22.0.07-95. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Источники техногенных чрезвычайных ситуаций. Классификация и номенклатура поражающих факторов и их параметров.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Test system for determination of tick-borne encephalitis virus antigen

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Шевелева Полина Геннадьевна		

Консультант отделения ИШПР:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В.	к.х.н.		

Консультант – лингвист отделения ШБИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент (ОИЯ, ШБИП)	Терре Д.А.	к.ф.н		

Schematic diagram of a solid-phase indirect non-competitive electrochemical immunosensor of the «Sandwich» type for determination of TBEV antigen is presented in Figure 1.

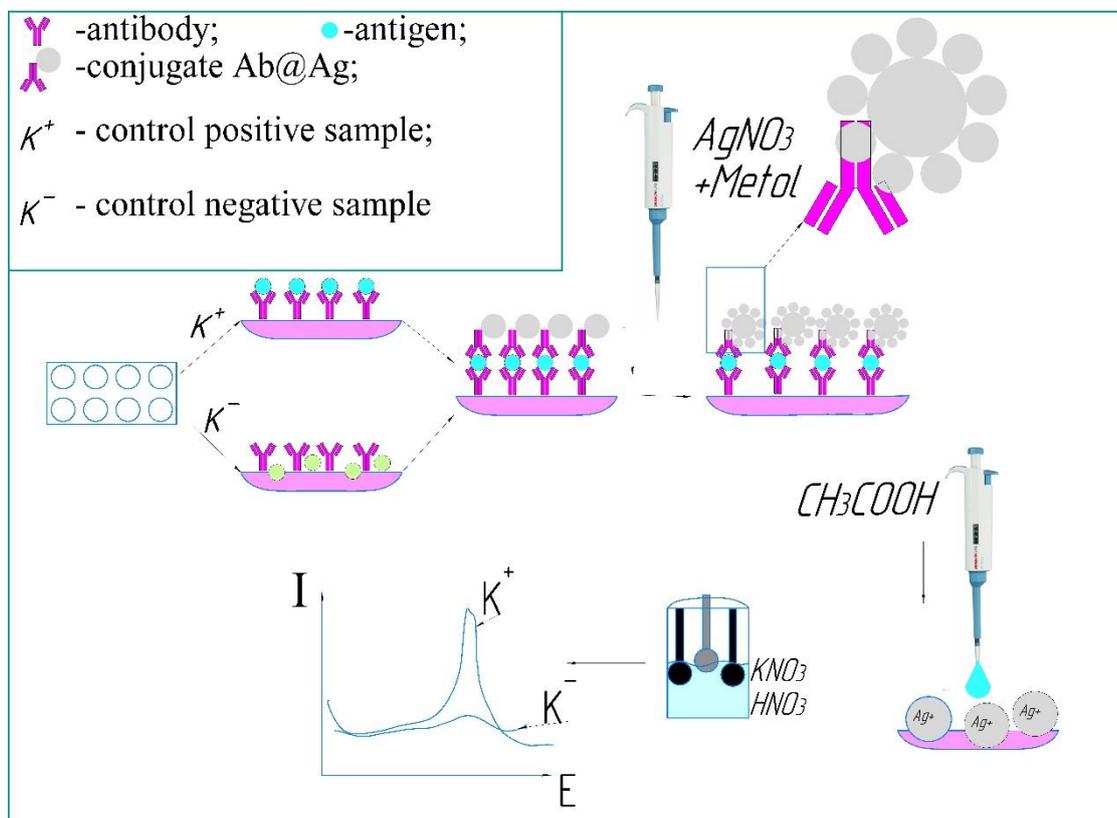


Figure 1 - Scheme of electrochemical immunoassay

We used a commercial test system in the wells of which monoclonal antibodies against TBEV were immobilized (VektoTBEV antigen, «Vector» JSC, Novosibirsk).

The VektoTBEV antigen reagent kit includes the following solutions for indirect non-competitive solid-phase electrochemical immunoassay of the «sandwich» type: K^+ - control positive sample containing TBEV antigen; K^- - control negative sample that does not contain TBEV antigen anti-species monoclonal anti-tick antibodies of various concentrations; FSB-T $\times 25$ - 25-fold concentrate of phosphate-saline buffer solution with tween, a solution for washing the map-case.

In addition, all commercial test systems use an enzyme label, the choice of which is determined by its high specific catalytic activity and ease of detection. But the enzyme label has such disadvantages as the long analysis time associated with the

inclusion of an additional stage of the enzymatic reaction using stop reagents, and a limited service life. Therefore, it was proposed in the work to replace the enzyme label of antibody conjugates with silver NPs, which have such advantages as stability and biocompatibility with antibodies, low cost, and high electrochemical activity. Thus, it was proposed in the work to replace the enzyme label with silver NPs in the synthesis of a conjugate with antispecific anti-mite antibodies (IgG). Much attention is paid to the selection of operating conditions for recording the analytical signal from silver LF and their Ab@Ag conjugates by the method of anodic inversion voltammetry. A model test system for determining TBEV antigen using Ab@Ag conjugates has been developed. A test system was tested to assess the content of a recombinant protein with the properties of the VCE antigen in the Encevir vaccine.

Characterization of silver nanoparticles

Silver nanoparticles were synthesized by chemical reduction of silver nitrate in sodium borohydride. The resulting colloid has a light yellow color, which can be seen in Figure 2.

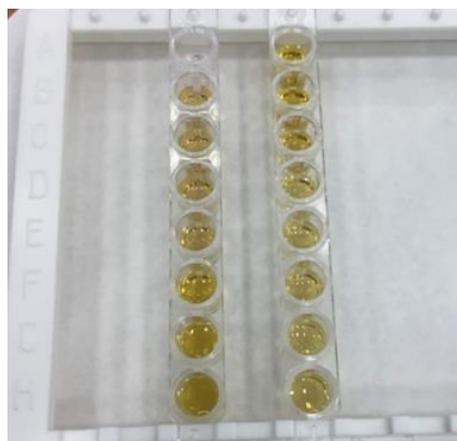


Figure 2 - Silver nanoparticles after synthesis

Spectrophotometric analysis can identify the formation of silver NPs. Based on the literature data, the silver colloid has a characteristic absorption peak in the wavelength range from 390 nm to 400 nm [39]. After the synthesis of silver NPs by chemical method, their absorption spectra were recorded (Fig. 3).

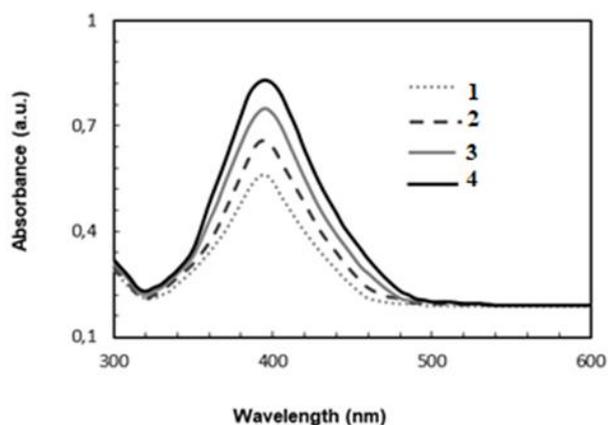


Figure 3 - Absorption spectra of colloidal solutions of silver NPs at various concentrations:

1 – $1.6 \cdot 10^{-4}$ M; 2 – $1.9 \cdot 10^{-4}$ M; 3 – $2.2 \cdot 10^{-4}$ M; 4 – $2.5 \cdot 10^{-4}$ M.

In figure 3.2, it can be observed that the obtained silver NPs has an absorption peak at a wavelength of 395 nm, which corresponds to the literature data. It can also be noted that with an increase in the concentration of silver colloid in solution, their absorption peak increases.

The morphology of silver NPs has been described using transmission electron microscopy (TEM). In Figure 4, we see that the obtained silver NPs have a spherical shape.

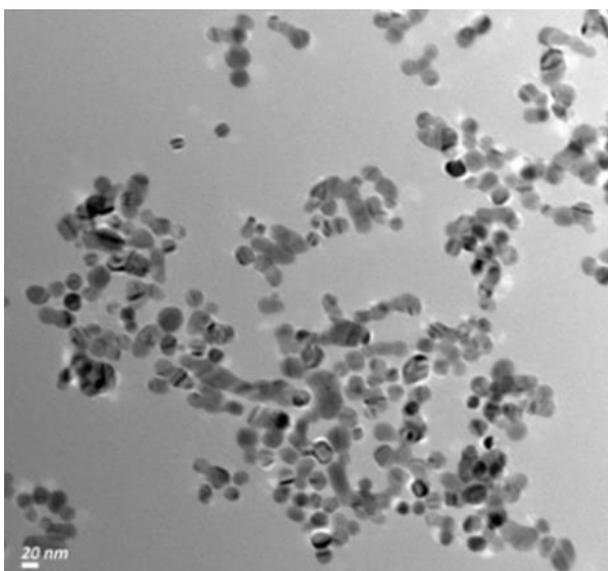


Figure 4 - TEM of silver NP after synthesis and concentration

According to the data of Figure 5, which shows a histogram of the distribution of silver NPs in size, the average colloid size is from 14 nm to 16 nm.

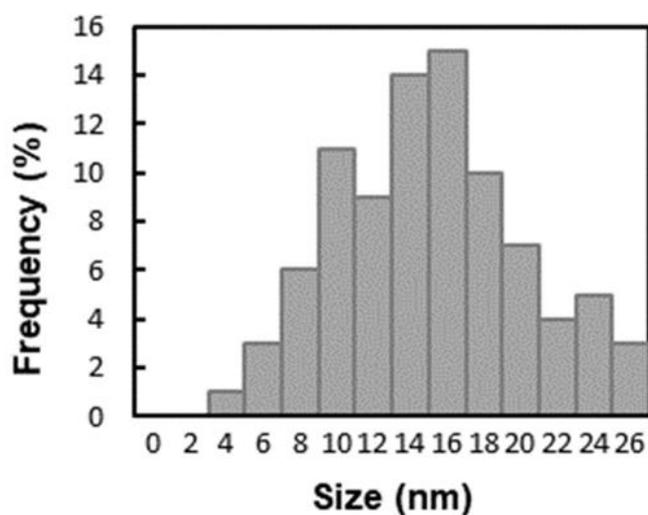


Figure 5 - Histogram of the distribution of silver NPs in size

In addition, studies of the voltammetric properties obtained by silver NPs were conducted in the mode of anode inversion voltammetry. Figure 6 shows voltammograms of silver NPs in the background electrolyte ($V_{\text{electrolyte}} = 7$ ml).

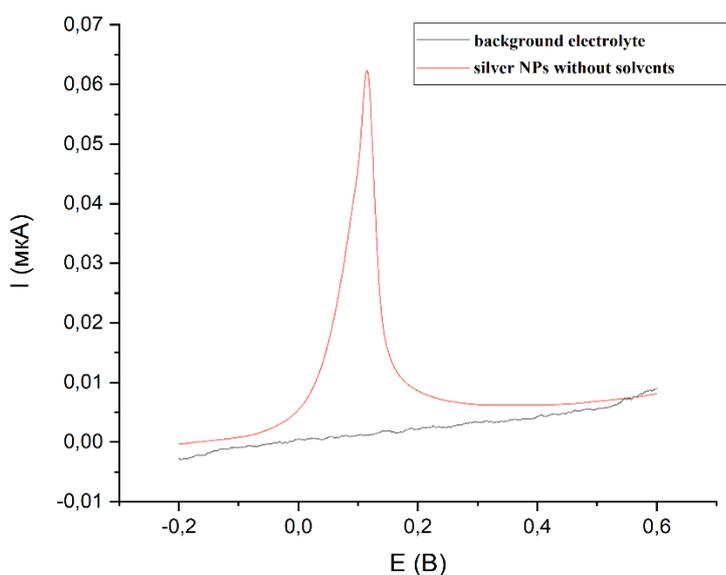


Figure 6 - Anodic inversion voltammograms of silver NPs.

$V = 40$ mV/s; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600$ V; $t_{\text{nak}} = 80$ s; background: (0.040 M KNO_3 + 0.15 M HNO_3); $V_{\text{silver NPs}} = 20$ μl

According to Figure 6, the oxidation potential of silver occurs at +0,200 V.

In accordance with the inversion voltammetric (IV) conditions for recording a signal from silver NPs, Ag^0 accumulates on the surface of the carbon-containing electrode (CCE) from the colloid at the potential and accumulation time of minus 0.600 V and 80 seconds, respectively. When the potential sweep is from - 0.2 to 0.6 V, the oxidation signal Ag^0 is recorded according to the scheme:

It is known that silver NPs are stabilized by a borohydride shell, which prevents the accumulation of silver conjugates on the surface of the CCE in the mode of inversion voltammetry (IV) [42].

In order to affect the sensitivity of the IV signal from silver NPs, it is necessary to transfer the colloid to the ionic state. This, in turn, will improve the stage of silver accumulation from the conjugate on the electrode and quantitatively transfer all ionic silver from the well of the tablet into the electrochemical cell. Thus, an important aspect in the work is the selection of a solvent that destroys the colloidal silver of Ab@Ag conjugates in the wells of the titration plate. For these purposes, several solvents were tested: hydrogen peroxide 3%, concentrated nitric acid, 70% tert-butyl hydroperoxide, and concentrated acetic acid.

The best solvent for colloidal particles, according to Figure 7, is organic peroxide, while acetic acid is the worst solvent.

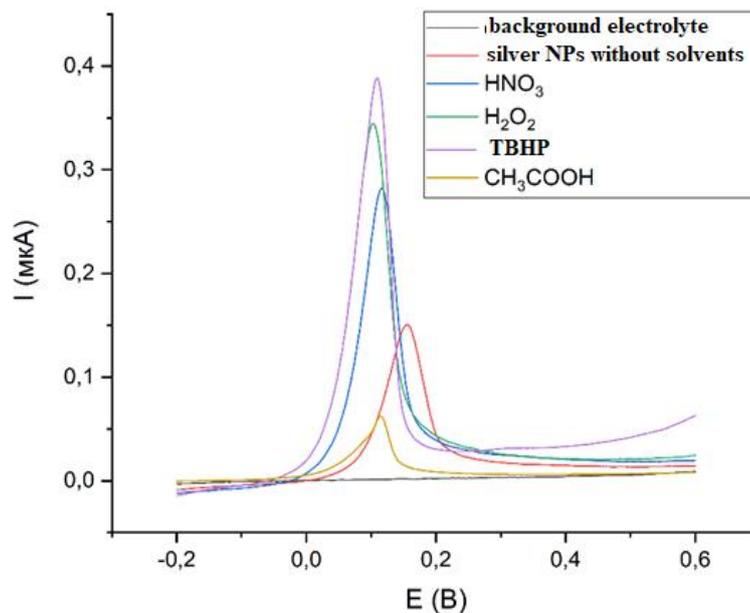


Figure 7 - Anodic inversion voltammograms of silver NPs after dissolution in various solvents.

$V = 40 \text{ mV / s}$; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600\text{V}$; $t_{\text{nak}} = 80\text{s}$; background: $(0.040 \text{ M KNO}_3 + 0.15 \text{ M HNO}_3)$; $V_{\text{silver NPs}} = 20 \mu\text{l}$; $V_{\text{solvent}} = 200 \mu\text{l}$

The voltammogram data are consistent with the absorption spectra of silver NPs before and after dissolution in various solvents (Fig. 8).

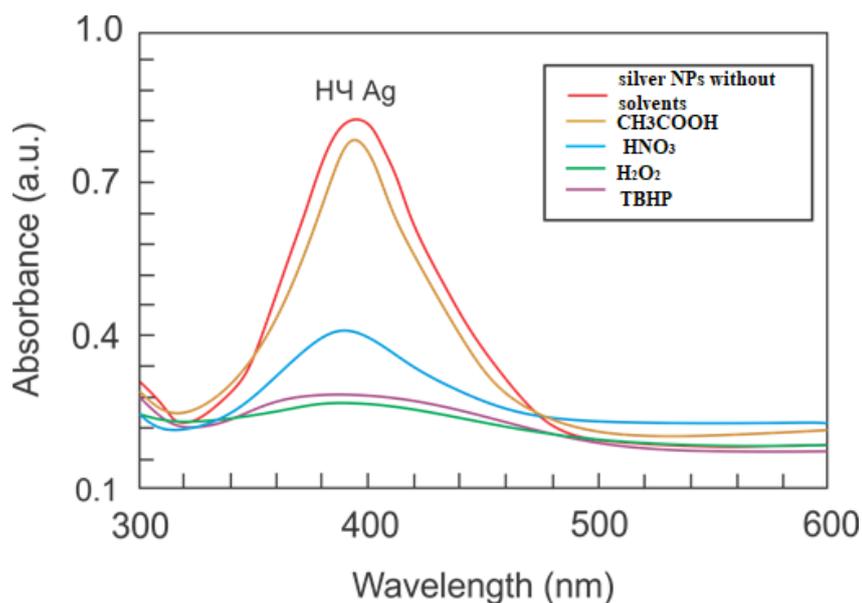


Figure 8 - Absorption spectra of silver NPs in various solvents

According to the spectra presented in Fig. 8, it is seen that the absorption maxima of silver NPs decrease and, in some cases, disappear, depending on the nature of the solvent. The best solvent for colloidal silver is organic peroxide. In addition, our results are confirmed by literature data, which say that hydrogen peroxide, both organic and non-organic, allows the colloid to dissolve, releasing ionic silver [44].

As a result of the experiment, spherical silver NPs with an average diameter of 14-16 nm were obtained, which were later used to produce conjugates with BSA (BSA@Ag) and anti-species monoclonal anti-tick antibodies (Ab@Ag). It was also found that it is best to use tert-butyl hydroperoxide 70% to dissolve the colloid.

Characterization of bioconjugates of silver nanoparticles with bovine serum albumin (BSA)

As known, an alternative approach for stabilizing nanoparticles is to modify their surface with antibodies, antigens, and proteins. It was noted that bovine serum albumin (BSA) shows a strong affinity for inorganic nanoparticles and serves as a protective agent to prevent agglomeration of nanoparticles. Therefore, BSA was chosen as a model protein that would show the model of binding of antibodies to silver NPs, since it is the cheapest and is often used as a block reagent to block unbound colloidal particles. BSA was prepared in a 1% aqueous solution. Then, BSA@Ag conjugate was prepared by the passive adsorption method.

To confirm that the BSA@Ag conjugate was formed, the absorption spectra of silver NPs and BSA@Ag were recorded (Fig. 9).

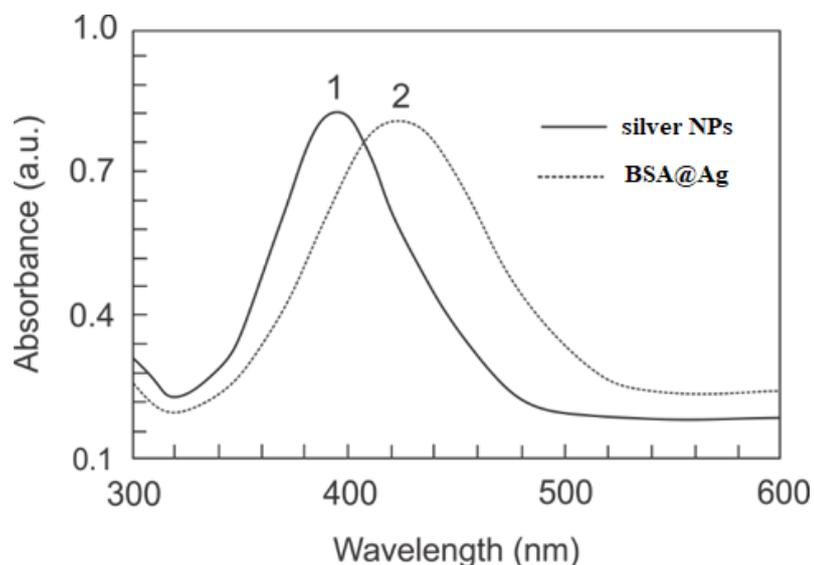


Figure 9 - Absorption spectra of silver NPs and BSA@Ag conjugate

In this figure, you can see the characteristic absorption peak from silver NPs at wavelength of 395 nm, while in the interaction of silver NPs with BSA, the received peak is shifted to a long wavelength region at $\lambda = 420$ nm.

In addition, we have studied properties of BSA@Ag conjugates. Figure 10 shows voltammograms of silver NPs and BSA@Ag conjugates.

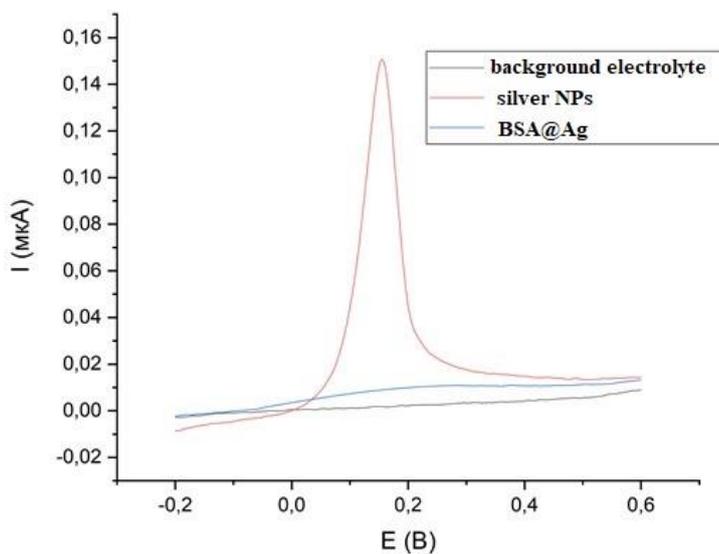


Figure 10 - Anodic inversion voltammograms of silver NPs and BSA@Ag conjugates.

$V = 40$ mV / s; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600\text{V}$; $t_{\text{nak}} = 80\text{s}$; background: (0.040 M KNO_3 + 0.15 M HNO_3); $V_{\text{silver NPs}} = 20 \mu\text{l}$; $V_{\text{BSA@Ag}} = 100 \mu\text{l}$

In this figure, we can observe that the protein passivates the surface of the electrode, so it is necessary to choose the appropriate solvent that would eliminate this problem. However, after receiving the BSA@Ag conjugate after 24 hours of storage, it was noticed that the set of solvents that well destroyed the colloid in the first case when there was no protein in the system is not suitable for dissolving silver from the BSA@Ag conjugate.

Based on literature data, it is known that during storage of silver NPs with protein solutions, a new Ag_2S phase forms around silver NPs. In literary sources, this phase is called the «hard coronas» [28]. To verify these data, we recorded a TEM of silver NPs immediately after receiving the BSA @ Ag conjugate and 24 hours later (Fig. 11 A; 12).

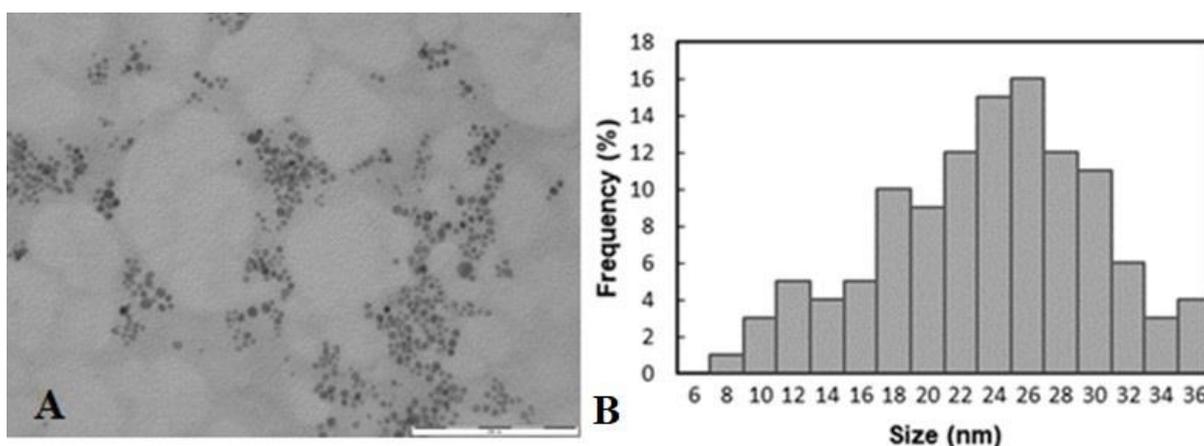


Figure 11 - A - TEM of the BSA@Ag conjugate immediately after synthesis; B - Histogram of the size distribution of silver NPs stabilized by BSA

In Figure 11 A, the silver NPs is stabilized by the BSA and the distribution pattern is fairly uniform. According to the data of Figure 11 B, which shows a histogram of the size distribution of silver NPs stabilized by BSA, the average size of the conjugates is 24 ± 2 nm. If we compare the histogram of the distribution of silver NPs with the histogram of the size distribution of BSA@Ag conjugates, we can conclude that the average colloid size without protein is 10 nm less than the BSA@Ag conjugate. Protein-stabilized silver NPs differ in size due to the fact that BSA are located on the surface of the colloid, which leads to enlargement of the particles. We

noticed that after daily storage of BSA@Ag conjugates, silver NPs form large conglomerates around which a shallow phase forms, which complicates the processing of the TEM image and the construction of a histogram of particle size distribution (Fig. 12).

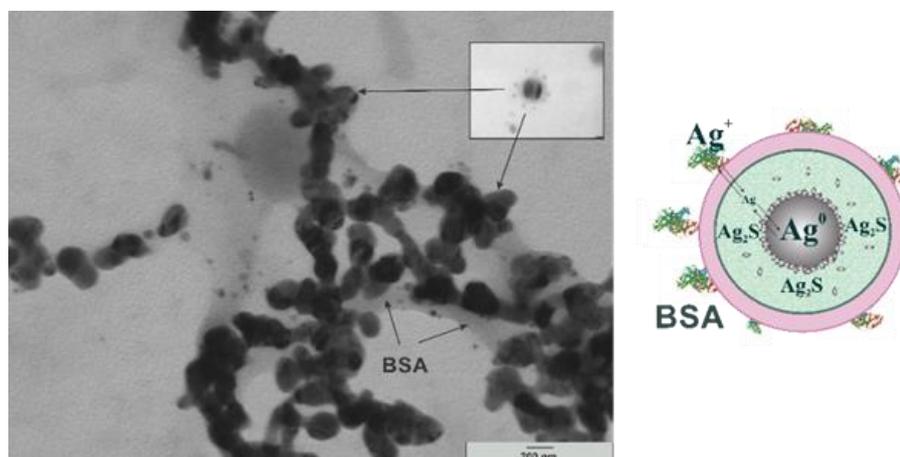


Figure 12 - TEM of BSA@Ag conjugate, 24 hours later

Based on the literature data, as well as a visual image of the TEM and a histogram of the distribution of silver NPs stabilized by BSA, we assume that during storage, silver NPs is overgrown with a new phase of silver sulfide, i.e., a «hard corona» is formed. Our assumptions were confirmed by experiment of selection of various solvents for silver NPs with BSA after daily storage. After the procedure of dissolution of BSA@Ag conjugates (after 24 h) in various solvents were recorded the IVA and absorption spectra (Fig. 13, 14).

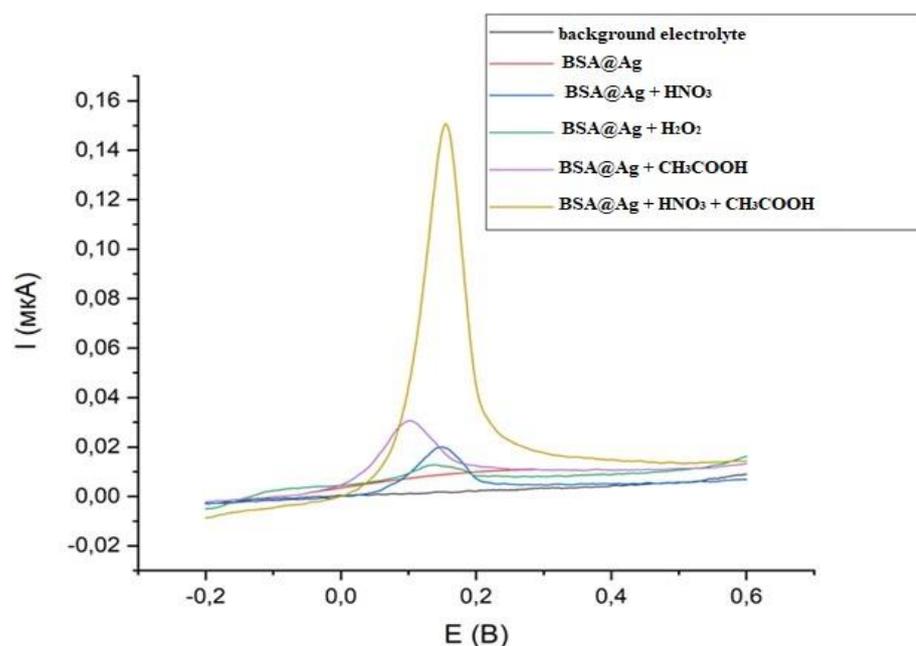


Figure 13 - Anodic inversion voltammograms of BSA@Ag conjugates in various solvents.

$V = 40 \text{ mV / s}$; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600\text{V}$; $t_{\text{nak}} = 80\text{s}$; background: $(0.040 \text{ M KNO}_3 + 0.15 \text{ M HNO}_3)$; $V_{\text{silver NPs}} = 20 \text{ }\mu\text{l}$; $V_{\text{BSA@Ag}} = 100 \text{ }\mu\text{l}$

Figure 13 shows that the «hard corona» is dissolved in acetic acid. This is due to the fact that silver sulfide is well soluble in this solvent. Also, the data obtained are consistent with the absorption spectra of the BSA@Ag conjugate in various solvents (Fig. 14), from which it can be seen that the best solvent is a mixture of acetic acid and nitric, while the worst solvent is hydrogen peroxide. Although protein denatures in all solvents, peroxide quickly decomposes and is not a solvent silver sulfide.

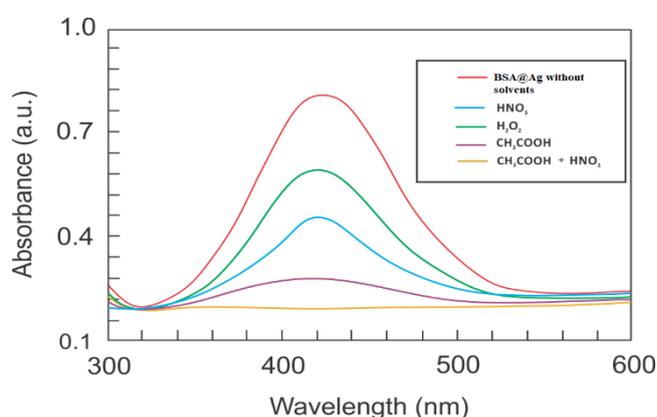


Figure 14 - Absorption spectra of the BSA @ Ag conjugate in various solvents

Based on the data obtained, we have selected an effective mixture of solvents - these are acetic and nitric acids. In this case, acetic acid allows you to dissolve the surface layer of silver sulfide, while nitric acid destroys the silver colloid itself.

Thus, an effective solvent silver of BSA@Ag conjugates was used, which is used to extract silver from the wells of the titration tablet, followed by transferring the sample to the electrochemical cell. In addition, we recommend using acetic acid as an effective solvent for the conjugate with antibodies Ab@Ag, and including nitric acid in the background electrolyte.

Test system assembly and silver signal amplification

Characterization of silver NP bioconjugates with anti-species monoclonal anti-tick antibodies

For testing the test system, silver NPs conjugates with antispecies monoclonal antibodies (Ab@Ag) were obtained by passive adsorption. The conjugate morphology was described using transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 15).

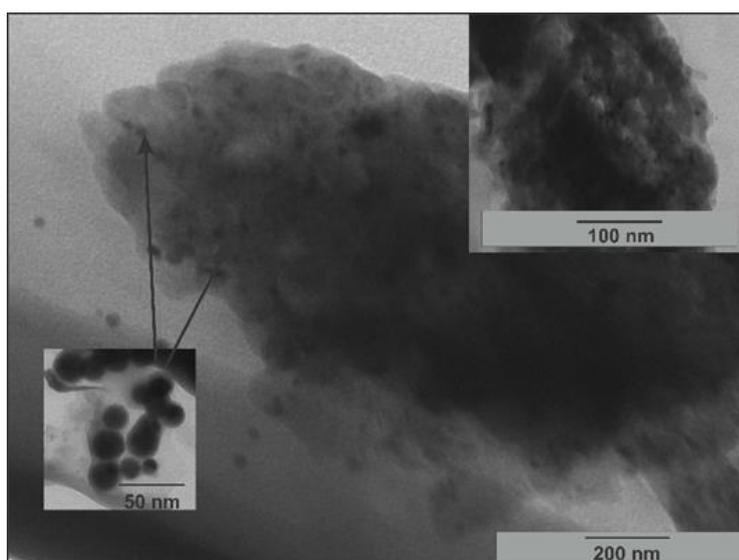


Figure 15 - TEM conjugate Ab@Ag

As can be seen in the figure, immunoglobulins bind to silver NPs. At a closer resolution, a finer phase of the «hard corona» Ag₂S is visible.

Based on the BSA@Ag conjugate, an effective solvent was selected that would dissolve both silver sulfide and the colloid itself. Therefore, Figure 16 shows the absorption spectra of BSA@Ag, Ab@Ag conjugates without solvent and with solvent.

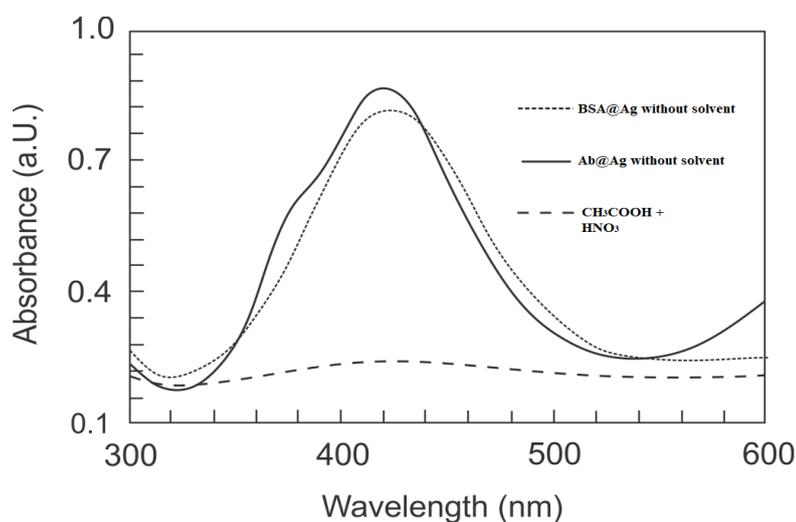


Figure 16 - Absorption spectra of conjugates BSA@Ag, Ab@Ag without solvent and with solvent

The figure shows that the absorption peak of the Ab@Ag conjugate without a solvent is visible at a wavelength of 420 nm, whereas with a solvent, the absorption peak disappears. This suggests that the solvent chosen by us dissolves the Ab@Ag conjugate and silver enters the ionic state.

The signal gain of the silver

To identify the TBEV antigen, we assembled a model test system, which is an analogue of the indirect non-competitive solid-phase ELISA of the «sandwich» type. To immobilize the antigen used titration microplates with immobilized anti-species monoclonal anti-tick IgG antibodies, control positive (containing antigen, K⁺) and negative (not containing antigen, K⁻) samples from a set of reagents for enzyme immunoassay detection of tick-borne encephalitis virus antigen (VektoTBEV antigen,

«Vector» JSC, Novosibirsk). After immobilization of the antigen and washing of the plates, Ab@Ag conjugates were added to each well. Further, the antigen analysis algorithm included the step of dissolving the silver conjugates with the subsequent transfer of the contents of the plate wells to the electrochemical cells.

To determine the tick-borne encephalitis virus antigen in the samples after the silver conjugates were dissolved, the method of anodic inversion voltammetry was used. Figure 17 shows voltammograms of the control positive (K^+) and control negative (K^-) samples.

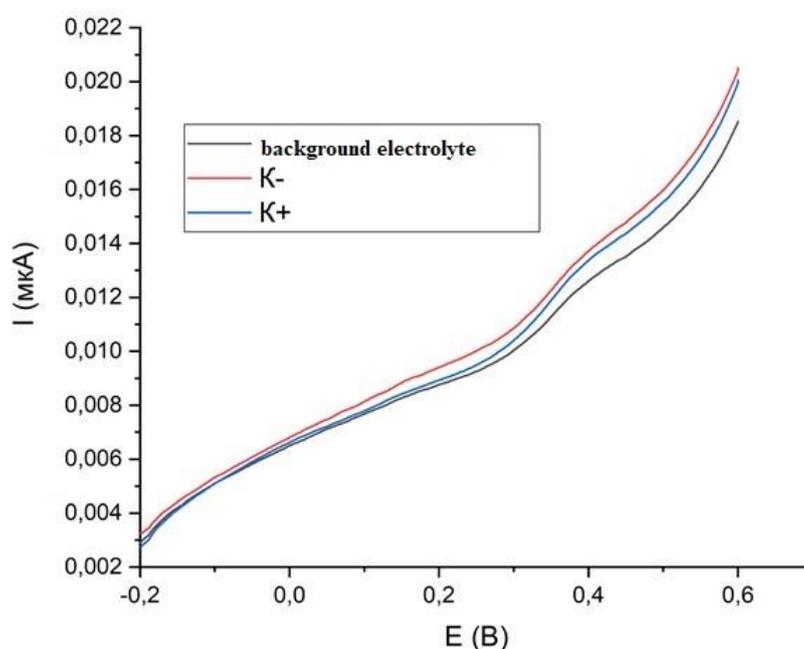


Figure 17 - Anodic inversion voltammograms of silver Ab@Ag conjugates after assembly of the test system:

K^+ - control positive samples;

K^- - control negative samples

$V = 40 \text{ mV / s}$; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600\text{V}$; $t_{\text{nak}} = 80\text{s}$; background: (0.040 M $\text{KNO}_3 + 0.15 \text{ M HNO}_3$); $V_{K^+ K^-} = 75 \mu\text{l}$; $V_{\text{Ab@Ag}} = 100 \mu\text{l}$; $V_{\text{solvent}} = 200 \mu\text{l}$

The figure shows that the signal from silver NPs is not observed both in negative samples that do not contain antigen, and in positive ones that contain antigen.

Due to the fact that no signal was received from the Ab@Ag conjugate, it was decided to amplify the silver signal with silver, using colloidal conjugate particles as catalysts for the growth of new crystals from the ionic phase in the presence of the chemical reducing agent metol, followed by the registration of IVA (Fig. 18).

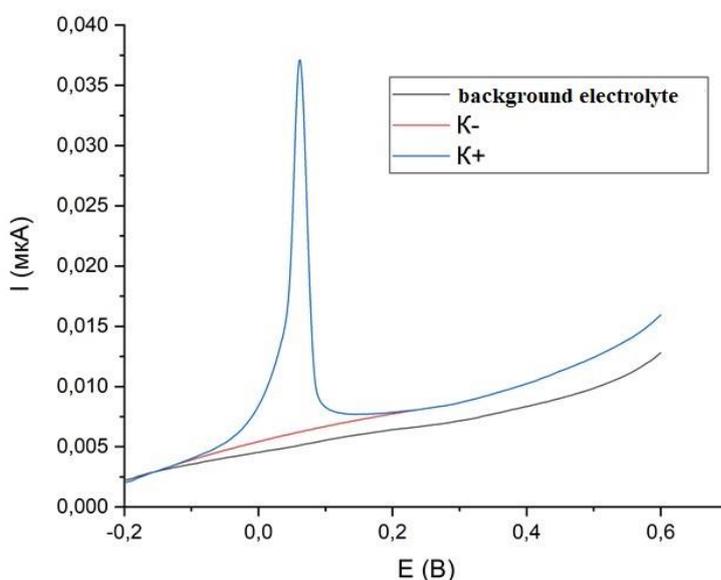


Figure 18 - Anodic inversion voltammograms of Ab@Ag conjugates after assembly of the test system and silver amplification:

K^+ - control positive sample;

K^- - control negative sample.

$V = 40 \text{ mV / s}$; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600 \text{ V}$; $t_{\text{nak}} = 80\text{s}$; background: $(0.040 \text{ M KNO}_3 + 0.15 \text{ M HNO}_3)$; $V_{K^+, K^-} = 75 \mu\text{l}$; $V_{\text{Ab@Ag}} = 100 \mu\text{l}$; $V_{\text{solvent}} = 200 \mu\text{l}$

In Figure 18, you can see that after the catalytic stage of the manifestation of ionic silver on silver NPs in the presence of a 1% metol reducing agent, a peak is observed in the positive control sample. This means that it contains TBEV antigen, while in the control negative sample there is no peak, respectively, this sample does not contain TBEV antigen.

Testing the test system for the determination of recombinant protein in the EnceVir vaccine

A mandatory step in the quality control of vaccines is to determine the authenticity of the content of recombinant protein with antigen properties in relation to TBEV. Our test system has such advantages as low cost and rapidity, therefore, it is proposed to use it to determine the recombinant protein that has TBE antigenic properties in the EnceVir vaccine.

Before staging the inverse voltammetric analysis, preliminary desorption of the TBEV antigen with aluminum hydroxide was carried out.

In the process of obtaining the vaccine, part of the antigen may remain on the microparticles of aluminum hydroxide, therefore, the sample preparation technique included analysis of the vaccine itself and analysis of fractions after centrifugation.

Voltammetric studies were carried out both in the vaccine itself and after desorption of the antigen from aluminum hydroxide particles (Fig. 19).

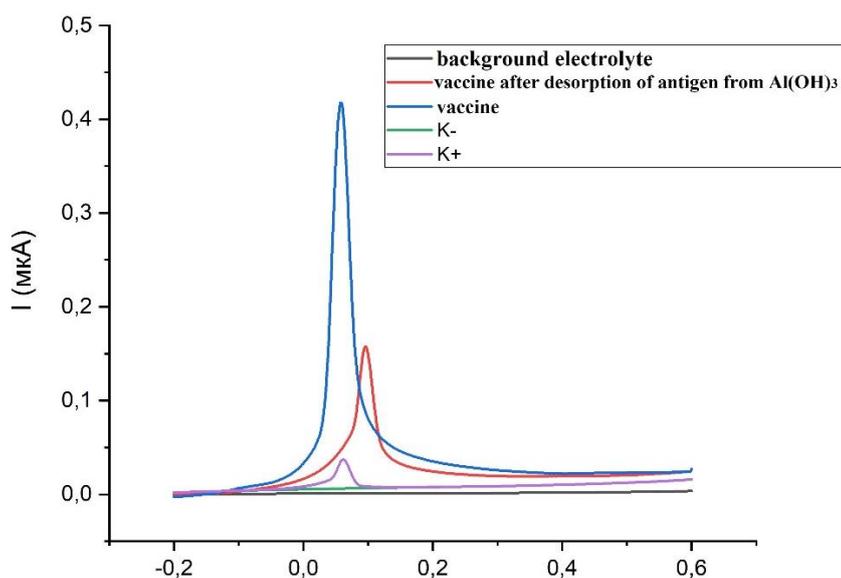


Figure 19 - Anodic inversion voltammograms of Ab@Ag conjugates after assembly of the test system and silver amplification:

K^+ - control positive sample;

K^- - control negative sample

$V = 40 \text{ mV / s}$; $E_{\text{nak}} = \text{minus } 0.600 \text{ V}$; $t_{\text{nak}} = 80\text{s}$; background: $(0.040 \text{ M KNO}_3 + 0.15 \text{ M HNO}_3)$; $V_{K^+, K^-} = 75 \mu\text{l}$; $V_{\text{Ab@Ag}} = 100 \mu\text{l}$; $V_{\text{solvent}} = 200 \mu\text{l}$

According to the figure, it can be seen that the vaccine itself contains a lot of recombinant protein, the value of which is higher than the control positive sample (K^+). Also, the voltammogram after desorption of the antigen in the vaccine from aluminum hydroxide particles confirms its presence on the sorbent particles.

Thus, the Ab@Ag conjugates and the proposed test system are suitable for the determination of recombinant proteins possessing TBE antigenic properties, and this test system, after modification, can be used to determine the TBEV antigen in the blood of humans and animals.