

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Христунова Екатерина Петровна

**РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА НА
ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент

Короткова Елена Ивановна

Томск – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Иммуноанализ и иммуносенсоры.....	11
1.2. Классификация иммуносенсоров	12
1.2.1 Оптические иммуносенсоры	13
1.2.2 Пьезоэлектрические иммуносенсоры.....	14
1.2.3 Электрохимические иммуносенсоры	15
1.3 Элементы распознавания в электрохимических иммуносенсорах	17
1.4 Сигналообразующие металлические метки в электрохимических иммуносенсорах	20
1.5 Биоконъюгирование. Общие сведения.....	24
1.6 Способы получения биоконъюгатов	25
1.6.1 Метод физической адсорбции. Нековалентное взаимодействие	25
1.6.2 Ковалентное взаимодействие.....	29
1.7 Клещевой энцефалит. Методы диагностики.....	33
1.8 Перспективы применения электрохимического иммуноанализа для диагностики flavivirusных инфекций	36
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	40
2.1 Оборудование, электроды, ячейки, посуда	40
2.2 Реактивы, приготовление растворов	43
2.3 Объекты исследования.....	44
2.4 Методика эксперимента.....	45
2.4.1 Методика получения наночастиц серебра	45
2.4.2 Получение биоконъюгатов на основе НЧ серебра с антителами к ВКЭ	46
2.4.3 Получение биоконъюгатов на основе НЧ серебра с фрагментами расщеплённых антител к ВКЭ.....	47
2.4.4 Методика исследования НЧ серебра и их биоконъюгатов методом катодной инверсионной вольтамперометрии	47
2.4.5 Методика исследования НЧ серебра и их биоконъюгатов методом анодной инверсионной вольтамперометрии	48

2.4.6	Методика сборки электрохимического иммуносенсора	48
2.4.7	Методика определения антител к ВКЭ вольтамперометрическим методом анализа	52
2.4.8	Методика определения антител к ВКЭ методом ИФА	52
2.5	Статистическая обработка результатов	54
ГЛАВА 3. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ БИОКОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА		
3.1	Характеристика полученных НЧ серебра и их биоконьюгатов	56
3.2	Электрохимические исследования НЧ серебра и их биоконьюгатов	59
3.2.1	Исследование электрохимических свойств НЧ серебра на электроде с обновляемой поверхностью.....	60
3.2.2	Исследование электрохимических свойств НЧ серебра на ИГЭ	62
3.2.3	Выбор рабочих условий определения НЧ серебра на ЗАУСЭ и ИГЭ методами инверсионной вольтамперометрии.....	63
3.2.4	Регистрация электрохимического отклика от биоконьюгатов методами инверсионной вольтамперометрии	70
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВКЭ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕЗИРОВАННЫХ БИОКОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ НЧ СЕРЕБРА		
4.1	Процедура иммобилизации антигена ВКЭ	72
4.2	Исследования электрохимического поведения НЧ серебра коньюгированных с антителами к ВКЭ на разных этапах модификации электрода	74
4.3	Применение биоконьюгатов полученных методом физической адсорбции ($Ab@AgНЧ$) для определения антител к ВКЭ	75
4.4	Применение биоконьюгатов полученных методом ковалентного взаимодействия ($Ab_s@AgНЧ$) для определения антител к ВКЭ.....	79
ГЛАВА 5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ-РАЗРАБОТАННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВКЭ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКОНЬЮГАТОВ $Ab@AgНЧ$, $Ab_s@AgНЧ$		
5.1	Установление предела обнаружения антител к ВКЭ с использованием электрохимического иммуносенсора	82

5.2	Подтверждение линейности градуировочных характеристик разработанного электрохимического иммуносенсора	83
5.3	Оценка правильности и специфичности разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ	87
5.4	Подготовка разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ к метрологической аттестации	90
ГЛАВА 6. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ.....		93
6.1	Определение концентрации антител в препарате иммуноглобулина человека против КЭ с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора	93
6.2	Определение концентрации антител в модельном растворе сыворотки крови человека с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		97
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ		99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		100
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Алгоритм выполнения расчетов по оценке показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора.....		113
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Расчет показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Ab@AgHЧ$		117
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Расчет показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Abs@AgHЧ$		123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Диагностика клещевого энцефалита (КЭ) в Сибирском регионе является важным вопросом в связи с распространенностью данного заболевания, которое характеризуется лихорадкой и способствует повреждению серого вещества головного мозга, что в свою очередь вызывает стойкое неврологическое и психиатрическое нарушение с возможным летальным исходом [1]. После инфицирования вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в организме человека развиваются специфические клеточные и гуморальные реакции, и в результате начинается выработка антител к этому заболеванию. Для подтверждения диагноза "клещевой энцефалит" проводят исследования по определению выработанных организмом специфических антител свидетельствующих о текущей либо перенесенной инфекции. Наиболее распространенный метод для обнаружения антител – иммуноферментный анализ (ИФА) [2], в котором при обнаружении молекул-мишеней в качестве метки для регистрации сигнала используют ферменты. Маркерные ферменты хранятся только при низких температурах или в консервирующих растворах, что приводит к необходимости периодической оценки их активности и рутинным валидационным процедурам ИФА тест-систем. Кроме того, для проведения ИФА необходимо сложное, дорогостоящее лабораторное оборудование, требующее высокой квалификации обслуживающего персонала.

Таким образом, несмотря на имеющийся метод ИФА, существует необходимость создания альтернативного метода определения антител к ВКЭ. В последнее десятилетие возрос интерес к разработке электрохимических иммуносенсоров для определения антител в клинических и биологических образцах, где вместо ферментной метки антивидовых антител используют наночастицы (НЧ) металлов. Такие электрохимические иммуносенсоры сочетают в себе специфичность иммунохимической реакции с преимуществами электрохимического обнаружения металлической метки и представляют собой новую тенденцию в разных областях аналитической химии, благодаря их высокой

чувствительности, низкой стоимости и присущей миниатюризации использованного оборудования [3].

Данное исследование открывает путь к разработке электрохимического иммуносенсора на основе наночастиц серебра для обнаружения соответствующих антител в крови человека и к контролю качества иммунологических продуктов, содержащих антитела к ВКЭ, которые используются в качестве постконтактной профилактики после укуса клеща.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к вирусу клещевого энцефалита в биологических объектах с использованием биоконъюгатов на основе наночастиц серебра.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- получить наночастицы серебра и осуществить разные стратегии биоконъюгирования антител к ВКЭ с НЧ серебра для создания конъюгатов со специфической активностью ($Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$);
- изучить электрохимические свойства синтезированных НЧ серебра и их биоконъюгатов на разных электродах: импрегнированный графитовый электрод (ИГЭ), золото-ансамблевый углеродсодержащий электрод (ЗАУСЭ);
- исследовать электрохимические свойства биоконъюгатов НЧ серебра на разных этапах иммобилизации антигена ВКЭ на поверхности ИГЭ;
- осуществить разработку алгоритма проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$);
- провести сравнительные испытания оценки специфичности и правильности разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ со стандартным методом ИФА;
- рассчитать основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ (показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности).

– провести апробацию разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ в реальных объектах анализа.

Научная новизна работы:

– Впервые определены способы получения стабильных и электроактивных биоконъюгатов на основе наночастиц серебра: $Ab@AgНЧ$, $Ab_s@AgНЧ$. Исследованы их электрохимические свойства. Показана возможность их использования для количественного определения антител к ВКЭ в электрохимическом бесферментном иммуноанализе, где НЧ серебра используются в качестве сигналообразующих меток.

– Разработан алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgНЧ$, $Ab_s@AgНЧ$ и широкодоступных углеродсодержащих материалов электродов. Установлено, что для определения антител к ВКЭ предпочтительнее регистрировать аналитический сигнал биоконъюгатов $Ab@AgНЧ$ методом катодной инверсионной вольтамперометрии (КИВ) с использованием золото-ансамблевого углеродсодержащего электрода (ЗАУСЭ) через труднорастворимое соединение $AgCl\downarrow$, а для биоконъюгатов $Ab_s@AgНЧ$ предпочтительнее использовать метод анодной инверсионной вольтамперометрии (АИВ) на импрегнированном графитовом электроде (ИГЭ) путем окисления Ag^0 на поверхности электрода.

– Найдены оптимальные условия проведения электрохимического иммуноанализа, обеспечивающие чувствительное (диапазон концентраций 100 – 1600 Ед/см³) и специфичное количественное определение антител к ВКЭ. Показана возможность применения разработанного электрохимического иммуносенсора в широком диапазоне концентраций (100 – 1600 Ед/см³) в реальных объектах (лекарственный препарат иммуноглобулин человеческий против КЭ, сыворотка крови человека).

Практическая значимость.

Разработан электрохимический иммуносенсор и методики для количественного определения антител к ВКЭ методами инверсионной

вольтамперометрии с использованием синтезированных $Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$, не требующий наличия сложного и дорогостоящего оборудования, который обладает сопоставимой чувствительностью с традиционным ИФА.

Разработанный электрохимический иммуносенсор можно рекомендовать к применению в аналитических лабораториях для контроля качества лекарственных препаратов, содержащих иммуноглобулин человеческого против КЭ. Кроме того, в диагностических лабораториях, он может являться альтернативой традиционно-используемому методу ИФА для определения антител к ВКЭ в образцах сыворотки крови человека.

Замена традиционно используемых в ИФА ферментных меток на сигналообразующую серебряную метку, в перспективе позволит значительно удешевить процедуру анализа, а также упростить технологию хранения реагентов.

Личный вклад автора: состоял в обобщении, систематизации литературных данных по разработке электрохимического иммуносенсора для диагностики заболевания КЭ, а также в проведении экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методики получения электроактивных $Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$ на основе НЧ серебра с оптимизацией соотношения компонентов. Результаты просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), подтверждающие взаимодействие НЧ серебра с антителами к ВКЭ и отображающие размер, формы и морфологию синтезированных НЧ серебра и их биоконъюгатов;

2. Результаты электрохимических исследований синтезированных НЧ серебра и их биоконъюгатов на разных электродах: ИГЭ, ЗАУСЭ методом инверсионной вольтамперометрии;

3. Результаты исследования электрохимических свойства биоконъюгатов НЧ серебра на разных этапах иммобилизации ИГЭ антигеном к ВКЭ;

4. Алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$);

5. Основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ (специфичность, показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности);

6. Результаты апробации разработанного электрохимического иммуносенсора для анализа реальных объектов и сравнение полученных данных со стандартным методом ИФА используемого в РФ для определения специфических антител к ВКЭ.

Апробация результатов работы: Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2017); VI International scientific conference «Theoretical and experimental chemistry» (Karaganda, 2017); 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis, IMA- 2017 (Heraklion, Greece, 2017); Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017); 1st Cross-Border Seminar on Electroanalytical Chemistry (Furth im Wald, Germany, 2018); 6th International Conference on Chemical Technology (Mikulov, Czech Republic, 2018); XIX Международной научно-практической конференции "Химия и химическая технология в XXI веке" студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2018); 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018) (Rhodos, Greece, 2018); 14th International Students Conference «Modern Analytical Chemistry» (Prague, Czech Republic, 2018); 7th International Symposium on Sensor Science (Napoli, Italy, 2019); XX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2019); X международной научной конференции «Современные методы в теоретической и экспериментальной электрохимии» (Плес, 2019).

Публикации: Результаты проведенных исследований отражены в 16 печатных работах, в том числе в 13 тезисах докладов на всероссийских и

международных конференциях, в 3 статьях научных журналов, индексируемые базами Web of Science и Scopus.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.х.н., профессору Коротковой Е.И. за постановку цели и помощь при написании диссертации. Особая благодарность к.х.н, доценту Е.В. Дорожке, д.х.н., профессору И. Бареку, д.х.н. Ph.D. В. Выскочилу, д.х.н., профессору Б. Кратохвилу за ценные советы и интерес к работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Исследования в области фармацевтики и биоматериалов» Химико-технологического университета, Прага (грант № A2_FCNT_2019_058); гранта специальных исследований университета Химического и технологического университета, Прага (грант № A2_FCNT_2020_016); гранта РФФИ № 19-53-26001 и Чешского научного фонда (проект GACR 20-01417J).

Структура и объём работы: Научно-квалификационная работа выполнена на 128 страницах машинописного текста и включает 28 рисунков, 21 таблицу и список литературы из 113 наименований

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Иммуноанализ и иммуносенсоры

История успешного применения иммуноанализов, основанных на взаимодействии антител с антигеном, насчитывает 60 лет. Первые результаты иммуноанализа с использованием радиоактивно меченых антигенов и антител для определения молекул инсулина были опубликованы в 1960 году в работах Ялоу и Берсон [4]. После чего произошёл мощный толчок в развитии иммуноанализа с использованием ферментных, флуоресцентных и других меток [5]. В настоящее время иммуноанализ широко применяется в различных областях, начиная от скрининга окружающей среды и продуктов питания до медицинской диагностики [6].

В течение последних десятилетий, было разработано много различных типов иммуноанализа, имеющих как принципиальные, так и второстепенные отличия. Основные методы проведения современных типов иммуноанализа отображены на рисунке 1.



Рисунок 1 – Классификация методов иммуноанализа

Для обнаружения антител к различным вирусным возбудителям в клинических и биологических образцах – иммуноанализы играют важную роль [7,8]. Наиболее широкое распространение и развитие для определения антител к

различным вирусным возбудителям получил гетерогенный (твердофазный) формат иммуноанализа [5]. При его проведении достигаются более низкие пределы обнаружения возбудителей. За счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции, использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции. К данному формату анализа в первую очередь относят ИФА [9]. Принцип ИФА заключается в специфическом взаимодействии комплекса «антиген-антитело», где ферменты используются в качестве меток для обнаружения молекул-мишеней [10].

Комбинирование иммуноанализа с современными высокочувствительными методами обнаружения привело к созданию иммуносенсоров [11]. Общеизвестно, что высокая чувствительность и селективность иммуносенсоров по распознаванию биологически активного компонента также обеспечивается специфическими взаимодействиями, достижимыми между антителом и его соответствующим антигеном [12]. Концепция работы иммуносенсоров схожа, либо эквивалента с проведением твердофазного иммуноанализа [6]. Таким образом, иммуносенсоры представляют собой аналитические устройства, основанные на принципах твердофазного иммуноанализа, где в зависимости от цели исследования на поверхности датчика иммобилизованы антитела или антигены [13].

1.2. Классификация иммуносенсоров

Иммуносенсоры являются очень мощными аналитическими инструментами, которые разработаны и применены для обнаружения широкого спектра веществ таких как, гормоны, раковые маркеры, биологические и инфекционные агенты, а также загрязнители окружающей среды – пестициды. Меняя различные параметры и конфигурации при производстве иммуносенсоров, можно приспособить их или адаптировать для различных целей [14]. С целью успешного применения иммуносенсоров многие недавние публикации были сосредоточены на стратегиях усиления сигнала для получения сенсоров с низким пределом

обнаружения и, следовательно, высокой чувствительностью. Например, объединение наноструктурированных материалов с различными функциональными группами, такими как карбоксильные и аминные группы, или с металлическими НЧ, такими как золото и серебро, может быть использовано для улучшения трансдукции сигнала [15]. Механизмы трансдукции сигнала, используемые в иммуносенсорах, могут быть основаны на генерации сигнала (электрохимического или оптического) или на изменении физико-химических свойств, таких как массовые заряды. В зависимости от типа преобразователя, иммуносенсоры можно разделить на три основных класса: оптические, пьезоэлектрические и электрохимические.

1.2.1 Оптические иммуносенсоры

Оптические иммуносенсоры основаны на изменениях фазы, амплитуды, поляризации или частоты входного света в ответ на процесс распознавания молекул [16]. Распространенные типы оптических иммуносенсоров включают в себя колориметрические, флуоресцентные, люминесцентные сенсоры, а также сенсоры, основанные на эффекте плазмонного резонанса. Элемент распознавания маркируется хромогенными или флуоресцентными метками, либо не содержит меток [17]. Оптические иммуносенсоры на основе эффекта плазмонного резонанса и флуоресценции являются одними из наиболее распространенных [18–20]. Применение флуоресцентного метода для разработки оптического иммуносенсора хорошо описано в работе [7]. При отражении на диэлектрической поверхности свет проникает во вторую фазу, которая имеет более низкий показатель преломления, чем у ядра; интенсивность далее экспоненциально уменьшается по мере проникновения (что обычно соответствует порядку падающей длины волны), и любые меченые антитела, расположенные близко к границе раздела фаз, переходят в возбуждённое состояние и подлежат обнаружению. Квантовые точки, как наиболее подходящие флуоресцентные метки, нашли широкое применение в разработке флуоресцентных иммуносенсоров, из-за их высокого квантового выхода флуоресценции и

чувствительности к изменениям окружающей среды при связывании белков. Аояги и др. [21] предложен регенерируемый и портативный оптический иммуносенсор для сверхчувствительного определения иммуноглобулина класса G (IgG) на основе изменения интенсивности флуоресценции квантово-точечного меченого белка А. В другом исследовании авторами [22] разработан безметочный оптический иммуносенсор на основе эффекта плазмонного резонанса для выявления вируса гриппа с использованием карбоксилированного декстранового полимерного матрикса для связывания моноклонального антитела HC10.

Оптические иммуносенсоры считаются одним из самых чувствительных (позволяют определять аналиты вплоть до пг/см^3) [23], – однако требуют приобретения сложного, зачастую дорогостоящего оборудования.

1.2.2 Пьезоэлектрические иммуносенсоры

Пьезоэлектрические иммуносенсоры основаны на изменении частоты колебаний пьезокварцевого резонатора при увеличении или уменьшении массы биорецепторного покрытия за счет образования или разрушения на его поверхности иммунного комплекса [24]. Контроль частоты колебаний позволяет определить изменение массы, которое пропорционально концентрации анализируемого вещества. Традиционным материалом для создания сенсоров, работающих на пьезоэлектрическом эффекте, является кварц, обладающий высокой химической и термической устойчивостью, что не оказывает влияние на пьезоэлектрические свойства [25]. Одним из примеров является разработка иммуносенсора, основанного на пьезоэлектрическом принципе для определения С-реактивного белка [26]. В другом исследовании авторами предложен иммуносенсор для определения биомаркера сердечных заболеваний тропонина (сTnT). Другая группа авторов [27] использовала ангармонические взаимодействия полистирольных микросфер на платформе кварцевого кристалла. Ангармонизмы основаны на том, как различные взаимодействия на поверхности сенсора влияют на гармонические резонансные частоты по-разному, что позволяет идентифицировать анализируемый материал.

Толчки, падение, сильная вибрация могут существенно повлиять на результат измерений, что является основным недостатком применения пьезоэлектрических иммуносенсоров. Кроме того, высокие колебания температур могут повредить кристаллы кварца, поэтому необходимо обратить особое внимание на эксплуатацию пьезоэлектрических иммуносенсоров.

1.2.3 Электрохимические иммуносенсоры

Электрохимические иммуносенсоры преобразуют информацию, связанную с электрохимическими реакциями, в соответствующий качественный или количественный сигнал [28]. По типу преобразователя сигнала электрохимические (ЭХ) иммуносенсоры делятся на три типа: потенциометрические (измерение потенциала электрода или разности потенциалов), кондуктометрические (измерение проводимости или сопротивления) и амперометрические / вольтамперометрические (измерение тока) [29]. Обзор литературы за последние десять лет позволяет выделить в отдельную группу вольтамперометрические иммуносенсоры.

Вольтамперометрическое определение обычно требует наличия рабочего (индикаторного), вспомогательного электродов и электрода сравнения. Поскольку ЭХ реакции обычно происходят в непосредственной близости от поверхности электрода (на границе раздела электрод–раствор), выбор электродов для проведения исследований играет решающую роль в работе электрохимических иммуносенсоров. В качестве электрода сравнения обычно используют хлоридсеребряный электрод (ХСЭ), который располагают вблизи рабочего электрода для измерения потенциала индикаторного электрода. Рабочий электрод служит элементом трансдукции в иммунохимической реакции, в то время как вспомогательный устанавливает взаимосвязь с электролитическим раствором таким образом, чтобы к рабочему электроду можно было подать ток. Все электроды должны обладать как хорошей проводимостью, так и быть химически стабильными. Зачастую рабочий электрод является платформой для иммобилизации биологического материала. Выбор материала, размера рабочего

электрода, модификация его поверхности, значительно влияют на способность обнаружения молекул мишеней. Превосходный обзор материалов рабочих электродов, используемых для разработки электрохимических иммуносенсоров, представлен в работе [30].

Главной проблемой в ЭХ иммуносенсорах является достижение чрезвычайно низкого предела обнаружения. Одним из современных направлений решения этой проблемы является изготовление высокочувствительных электрохимических иммуносенсоров с использованием нанотехнологий; например, биофункционализация наноматериалов, которые используются в качестве катализатора, метки или биосенсорного преобразователя [31]. Такие наноматериалы, как углеродные нанотрубки, углеродные наностержни, металлические наночастицы золота и серебра, магнитные наносферы, уже нашли широкое применение для создания ЭХ иммуносенсоров [32]. Еще одним немаловажным условием в разработке высокочувствительных ЭХ иммуносенсоров является процесс иммобилизации биологического материала на поверхности трансдьюсера [33]. Существует множество стратегий для проведения процесса иммобилизации. Физическая адсорбция, кросс – сшивка и ковалентная иммобилизация являются одними из наиболее распространенных стратегий. Примеры использования данных стратегий для разработки ЭХ иммуносенсоров отображены в таблице 1.

Таблица 1 – Классификация стратегий иммобилизации

Стратегия иммобилизации	Механизм связывания	Преимущества	Недостатки
Физическая адсорбция	Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия	Простота выполнения, низкая стоимость	Низкая стабильность взаимодействия
Кросс – сшивка	Сшивающие агенты: глутаровый альдегид, хитозан	Прочное связывание	Возможна потеря активности биомолекул
Ковалентное связывание	С участием функциональных групп (карбоксо- и аминогруппы)	Увеличение воспроизводимости анализа	Применение токсичных реагентов

Кроме того, в процессе разработки ЭХ иммуносенсоров необходимо уделять внимание получению электрохимически активных элементов

распознавания, которые обуславливают высокую специфичность обнаружения конкретной молекулы мишени.

Выбор правильной конструкции иммуносенсора, техники определения во многом влияет на результат измерений. Среди выше представленных иммуносенсоров, электрохимические иммуносенсоры представляют особый интерес благодаря их простоте изготовления, низкой стоимости, высокой чувствительности, избирательности к электроактивным анализам и возможности миниатюризации. Электрохимическое определение имеет много преимуществ по сравнению с другими методами, что приведет к расширению применения данного метода в ближайшем будущем. Разработка электрохимических иммуносенсоров является неотъемлемой частью современной аналитической химии и привлекает к себе огромное внимание в современном мире.

1.3 Элементы распознавания в электрохимических иммуносенсорах

Различные виды элементов распознавания используются для разработки высокочувствительных ЭХ сенсоров, которые обуславливают возможности их применения [34]. Основные их типы отображены на рисунке 2.



Рисунок 2 – Основные виды элементов распознавания

Наличие в структуре молекулы окислительно-восстановительной группы может быть непосредственно использовано в качестве электроактивного элемента

распознавания. Такие элементы распознавания, как антитела, фрагменты антител, аптамеры и антигены, используемые для создания ЭХ иммуносенсоров, обладают высокой специфичностью для обнаружения конкретной молекулы мишени [35]. Однако они чаще являются электрохимически неактивными, поэтому их используют в качестве платформы для иммобилизации сигналообразующих меток [36]. Таким образом, комбинирование элементов распознавания с сигналообразующими метками, т.е. получение биоконъюгата, может дать продуктивные результаты.

Среди других элементов распознавания антитела наиболее широко используются при разработке ЭХ иммуносенсоров благодаря их высокой специфичности связывания антитело-антиген. Из числа антител, чаще всего используются иммуноглобулины класса G (IgG), которые состоят из одного F_c (от англ. fragment crystallizable — способный кристаллизоваться) и двух F_{ab} (от англ. antigen binding fragment — антиген-связывающий фрагмент) фрагментов [32]. Общий план строения IgG отображен на рисунке 3.

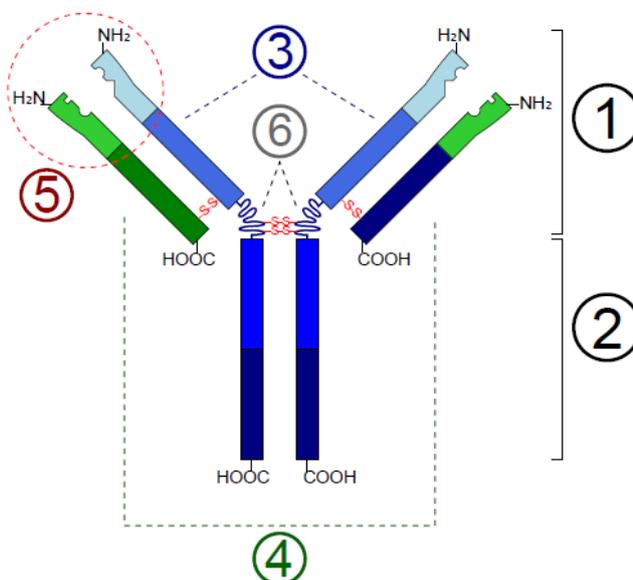


Рисунок 3 – Общий план строения иммуноглобулинов: 1) F_{ab}; 2) F_c; 3) тяжёлая цепь; 4) лёгкая цепь; 5) антиген-связывающийся участок; 6) шарнирный участок

Имуноглобулины (антитела) продуцируются в организме человека дифференцированными В-клетками в ответ на сопутствующий антиген во время

иммунного ответа [37]. Необходимо понимать, что антитела, собранные из плазмы крови, представляют собой смесь продуктов из множества различных клонов плазматических клеток, и они реагируют со многими эпитопами (антигенные детерминанты). Количество продуцирующих клонов зависит от индуцирующих антигенных эпитопов [38]. На практике невозможно выделить специфические антитела одного клона из этих смесей, известных как поликлональные антитела (пАт). Иммуноглобулины, продуцируемые клоном, продуцирующим одну плазматическую клетку, являются специфичными в отношении одного эпитопа. Эти специфические антитела называются моноклональными (мАт), и именно они, в основном, используются в качестве элементов распознавания при разработке ЭХ иммуносенсоров [29].

Антитела содержат антигенные активные сайты, называемые пара-топами, для специфического связывания целевого патогена по принципу "замок-ключ" [39]. Однако они очень чувствительны к окружающей среде, поэтому необходимо уделять внимание методам модификации (конъюгированию) и иммобилизации антител на поверхность. Антитела становятся неактивным, когда фрагмент F_{ab} связывается с сигналообразующей меткой, в результате чего не остаётся сайтов связывания с антигеном [40]. Лу и соавторы [40] сообщили о трехкратном увеличении активации при правильной (контролируемой) ориентации. Таким образом, выбор правильной стратегии может минимизировать серьезные потери их биологической активности. В качестве платформы иммобилизации антител и проведения иммунологической части эксперимента может выступать как поверхность рабочего электрода, так и стенки пробирок, 96-луночные и др. планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки. Причины потери активности антител включают в себя стерические помехи в случаях, когда их концентрация слишком высока, а также денатурацию из-за неспецифических взаимодействий с поверхностью или сигналообразующей меткой [40].

Фрагменты антител, как элемент распознавания, становятся надежной альтернативой антителам. Они обеспечивают специфичность, как и целые

антитела, но их молекулы меньше, что может выступать преимуществом в иммуносенсорике. Чаще всего используются фрагменты IgG [41–43], в которых отсутствуют фрагменты лёгкой цепи F_c (Рис. 3), несмотря на это они специфически связываются с антигеном [44]. Викхолм и соавторы адсорбировали фрагменты F_{ab} непосредственно на золото, и внедрили их в полимер, отталкивающий белок, так что из полимера выступал только антигенсвязывающий сайт [45].

Практическое применение таких элементов распознавания, как антитела, отображено в работах по электрохимическому обнаружению гепатита С [40], таких маркеров рака как раково-эмбриональный антиген (РЭА) [46], углеводный антиген 19-9 (CA19-9), карциномный антиген 125 (CA125), онкомаркер CA15-3, хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) [47] и простат-специфический антиген (ПСА) [48] и других.

1.4 Сигналообразующие металлические метки в электрохимических иммуносенсорах

Для достижения высокой чувствительности определения антител к различным вирусным возбудителям многие авторы используют такие сигналообразующие метки как квантовые точки [49], НЧ металлов [50] и ферменты [51]. Большинство работ основано на применении ферментов [51,52], таких как пероксидаза [53], глюкозооксидаза [54], щелочная фосфатаза [55] и эстераза [56]. Однако существенным недостатком использования ферментов является потребность в применении специального субстрата, обеспечивающего протекание сигналообразующей реакции для электрохимического определения аналита. Кроме того, возможно снижение активности фермента во времени, что приводит к необходимости периодической оценки их активности.

В качестве альтернативы ферментам себя хорошо зарекомендовали НЧ благородных металлов, как сигналообразующие метки [57]. Основные преимущества применения НЧ благородных металлов: обладают большей площадью поверхности, электрохимически активны, способны связываться с

биомолекулами [58]. Большинство публикаций, посвященных электрохимическому обнаружению биомолекул, используют НЧ серебра и золота [59–64], что свидетельствует о повышенном интересе к разработке электрохимических иммунологических методов на основе этих металлов.

На рисунке 4 приведен пример сборки электрохимического иммуносенсора формата «сэндвич» для определения антигена, где НЧ металла выступают в качестве сигналообразующих меток. Данный формат включает в себя иммобилизацию антител на подходящей функционализированной поверхности (1), иммунореакцию с антигеном (2) антителами, меченными НЧ металла (3), и завершающим этапом является электрохимическое обнаружения НЧ металла (Рис. 4).

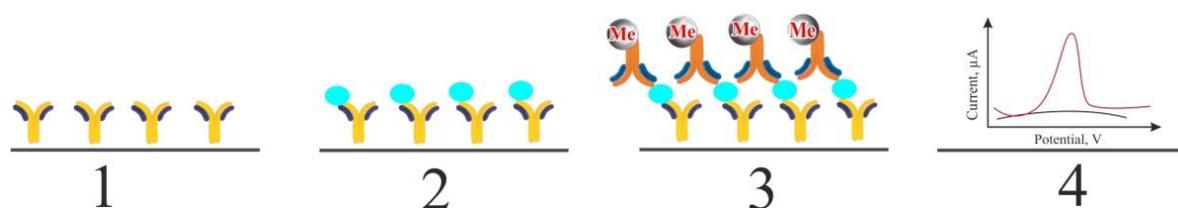


Рисунок 4 – Пример сборки электрохимического иммуносенсора формата «сэндвич», где НЧ металла выступают в качестве сигналообразующих меток

Следующим возможным вариантом сборки электрохимического иммуносенсора, где НЧ металла выступают в качестве сигналообразующих меток является формат непрямого неконкурентного иммуноанализа (Рис.5). Данный формат включает в себя иммобилизацию антигена на подходящей функционализированной поверхности (1), иммунореакцию с молекулами-мишенями (антителами) (2) антителами, меченными НЧ металла (3), и завершающим этапом является электрохимическое обнаружения НЧ металла (Рис. 4).

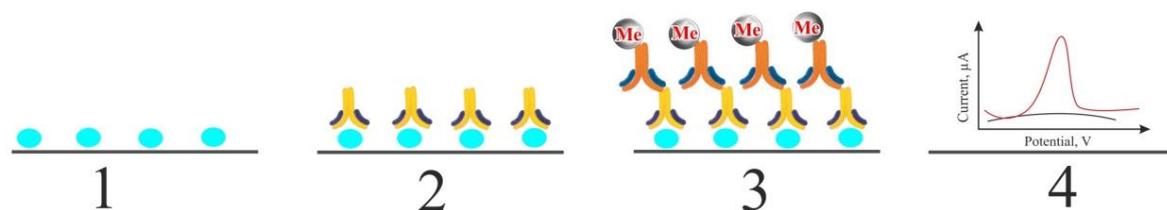


Рисунок 5 – Пример сборки электрохимического иммуносенсора формата непрямого неконкурентного иммуноанализа, где НЧ металла выступают в качестве сигналообразующих меток

Лим и соавторы [65] использовали НЧ золота конъюгированные с антителами, для создания ЭХ иммуносенсора формата «сэндвич». В работе авторы [65] осуществили электрохимическое определение путем предварительного окисления НЧ золота в кислой среде с последующим немедленным восстановлением $[\text{AuCl}_4]^-$ до Au^0 при дифференциально-импульсном режиме. Этот подход основан на окислительно-восстановительных свойствах НЧ золота в кислой среде, где целевой анализируемый хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) в образце был обнаружен путем количественного определения высвобожденных ионов золота. Другими авторами [66] был разработан ЭХ иммуносенсор, работающий по принципу непрямого неконкурентного иммуноанализа для определения антител к ВКЭ. В работе авторы использовали НЧ серебра, конъюгированные с антителами к ВКЭ, где электрохимическое определение проводилось путем обнаружения сигнала восстановления серебра в биоконъюгатах.

В случае применения НЧ металлов в качестве сигналообразующих меток возможно несколько путей их электрохимического определения. Одним из широко распространенных подходов для количественного определения НЧ металлов является их химическое растворение в кислой среде, поскольку металлические НЧ обладают высокой стабильностью, и обнаружение высвобожденных катионов металлов с помощью инверсионной вольтамперометрии. Для увеличения чувствительности определения аналита чаще используют метод анодной инверсионной вольтамперометрии, включающий этап

катодного осаждения ионов металла на поверхности электрода с последующим высвобождением накопленных металлов анодной вольтамперометрией. Именно благодаря электрохимическому концентрированию иона металла возможно достичь меньший предел обнаружения [67].

Наночастицы серебра как сигналообразующие метки в электрохимических иммуносенсорах

НЧ серебра в электрохимическом иммуноанализе обладают преимуществом среди других металлов благодаря их высокой проводимости, усиленному электрохимическому сигналу и относительно простым методам получения. Кроме того, необходимо отметить, что серебряные наночастицы являются перспективными метками благодаря их отличной способности связываться с биомолекулами (биоконъюгирование). Как уже было отмечено ранее, химическое растворение в кислой среде НЧ серебра и последующее их детектирование методом анодной инверсионной вольтамперометрии является основным подходом. Другой потенциальный метод обнаружения – прямое электрохимическое обнаружение НЧ серебра посредством твердофазного процесса Ag/AgCl , где НЧ серебра связываются с хлорид ионами в водном электролите, содержащем KCl . Согласно этому методу обнаружения, во время анодной развертки НЧ серебра окисляются до Ag^+ , а ионы Cl^- переносятся из электролита в твердую фазу для поддержания нейтральности заряда и образования $\text{AgCl}\downarrow$. После этого, катодной разверткой труднорастворимое соединение $\text{AgCl}\downarrow$ на поверхности электрода восстанавливается до металлического серебра (Ag^0), а хлорид ионы (Cl^-) диффундируют обратно в раствор, при этом, в результате изменения направления развертки в сторону более положительных потенциалов серебро повторно окисляется до $\text{AgCl}\downarrow$. Величина тока зависит от количества Ag и, следовательно, от концентрации целевого аналита. На основе твердофазного процесса Ag/AgCl , Тинг и соавторы [68] предложили сверхчувствительный иммуносенсор для обнаружения ПСА. Другими авторами [66] был разработан ЭХ иммуносенсор для

определения антител к ВКЭ, где электрохимическое определение также происходило через образование труднорастворимого соединения $\text{AgCl}\downarrow$.

Совместно с антителами (элементами распознавания) и электроактивными медиаторами (сигналообразующими метками) ЭХ иммуносенсоры обеспечивают низкие пределы обнаружения при относительно быстром времени проведения анализа. На основании вышеизложенного материала возможно сделать следующий вывод: использование НЧ металлов позволяет разрабатывать инновационные электрохимические иммуносенсоры и открывать бесконечные возможности для стратегий усиления сигналов, тем самым повышать эффективность определения биологического материала.

1.5 Биоконъюгирование. Общие сведения

Биоконъюгирование включает в себя связывание двух или более молекул с образованием нового комплекса, имеющего объединенные свойства его отдельных компонентов. Таким образом, белок, способный дискретно связываться с молекулой-мишенью в сложной смеси, может быть сшит с другой молекулой, которая может быть обнаружена с образованием следового конъюгата [69]. Компонент обнаружения обеспечивает видимость для целевого компонента, создавая комплекс, который можно использовать для измерения. Применение доступных методов сшивания для создания новых биоконъюгатов со специфической активностью сделало возможным проводить анализ малых концентраций веществ. Способность химически присоединять одну молекулу к другой привела к появлению различных отраслей промышленности, обслуживающих терапевтические, диагностические и исследовательские сферы деятельности. Значительная часть всех биологических анализов, включая клинические испытания, в настоящее время проводится с использованием уникальных конъюгатов, которые обладают способностью взаимодействовать с определенными аналитами в растворах, клетках или тканях [70]. Сшивающие и модифицирующие агенты могут применяться для изменения нативного состояния и функции пептидов и нуклеиновых кислот, белков, почти любой другой

биологической молекулы, которую можно химически дериватизировать. С помощью тщательных стратегий модификации или конъюгации можно исследовать структуру и функцию белков, обнаружить конформацию активного сайта или выявить взаимодействие рецептора и лиганда. Без развития биоконъюгатной химии для получения ассоциированных меченых, модифицированных или сопряженных молекул большая часть исследований в области естественных наук, как мы знаем это сегодня, была бы невозможна.

Важным этапом в разработке высокочувствительных и селективных электрохимических иммуносенсоров является получение биоконъюгатов. Биоконъюгат – комплекс между элементом распознавания и сигналообразующей меткой. Как уже было изложено ранее в качестве элемента распознавания чаще используют антитела, а сигналообразующей меткой могут выступать НЧ металлов.

1.6 Способы получения биоконъюгатов

Существует множество стратегий для проведения процесса биоконъюгирования, поэтому рассмотрим только некоторые из них, применимые к конъюгированию между антителами и НЧ металла.

1.6.1 Метод физической адсорбции. Нековалентное взаимодействие

Метод физической адсорбции является одним из самых простых способов получения биоконъюгатов, который основывается на силах притяжения (Ван-дер-ваальсовых силах), водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий [71]. Физическая адсорбция подразумевает прямую связь, которая не включает никакой химической модификации между антителами и НЧ и происходит путем простого смешивания двух компонентов, приводящей к иммобилизации. Метод физической адсорбции был успешно применён Танака и соавторами [72], которые показывают иммобилизацию моноклональных антител на поверхности НЧ золота путем физической адсорбции без участия каких-либо химических соединений. Полученные биоконъюгаты затем использовались в качестве метки в иммуносенсорах для обнаружения антител к хорионическому

гонадотропину (ХГЧ) и ПСА в сыворотке крови человека. Обычные иммуноанализы для выявления рака предстательной железы включают количественное определение количества ПСА на основании соотношения свободного ПСА к общему ПСА. По сравнению с обычным методом обнаружения, была достигнута более высокая чувствительность определения с использованием данных биоконъюгатов. В другом исследовании Соколов и соавторы [73] используют НЧ золота для конъюгирования с анти-эпидермальным фактором роста (анти-EGFR), и иммуноглобулином G (IgG) посредством физических взаимодействий. Понижая изоэлектрическую точку (pI) антител IgG, они смогли получить необратимые и высокостабильные биоконъюгаты. Данные биоконъюгаты нашли применение для маркировки раковых клеток шейки матки и продемонстрировали в 50 раз более высокую светорассеивающую способность по сравнению с немечеными раковыми клетками шейки матки. Иммобилизация антител на НЧ серебра была описана авторами [74]. В работе представлены различные протоколы для успешной иммобилизации антител на НЧ серебра методом физической адсорбции и изучено, как изменение условий отражается на конечном биоконъюгате. Ван и соавторы [75] разработали высокоспецифичный электрохимический иммуносенсор для анализа раковых клеток с использованием маркировки НЧ серебра, меди и палладия. В протоколе к данной публикации описано, что инкубация металлических НЧ с антителами проводилась при комнатной температуре, что приводило к адсорбции антитела на поверхности НЧ металла посредством ионных и гидрофобных взаимодействий. Кроме того, нами опубликована работа [66], где НЧ серебра были использованы для получения биоконъюгата. В работе пассивная адсорбция была выбрана в качестве стратегии связывания НЧ серебра с антителами к ВКЭ. Это лишь малый обзор работ, в которых заряд или другие физические явления приводят к успешной конъюгации НЧ металлов с антителами. В большинстве работ используются протоколы биоконъюгации, основанные на комбинации электростатических и гидрофобных взаимодействий между антителом и поверхностью НЧ серебра или золота. Данные биоконъюгаты

находят широкое применение в области разработок электрохимических иммуносенсоров.

На рисунке 6 изображено схематическое представление нековалентных взаимодействий между отрицательно/положительно заряженными НЧ и антителами, опосредованных электростатическими притяжениями, приводящими к образованию биоконъюгатов антитело–наночастица (Рис. 6).

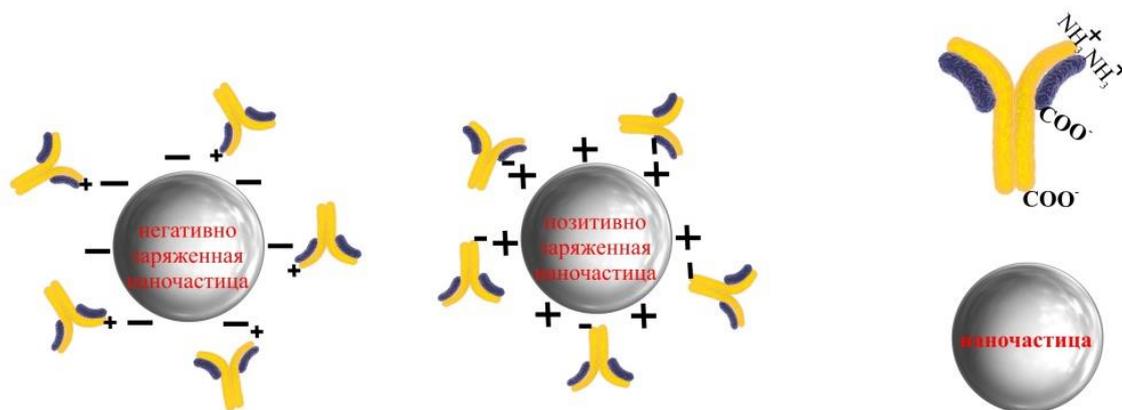


Рисунок 6 – Схематическое представление нековалентных взаимодействий антитело–наночастица

Положительные и отрицательные заряды, присутствующие на аминокислотах антител служат якорями при их взаимодействии с поверхностью наночастиц. Даже небольшое изменение рН приведет к демобилизации антител из НЧ [76], поэтому важно контролировать рН раствора, опираясь на изоэлектрические точки антитела и наночастиц.

При применении метода физической адсорбции необходимо учитывать факт, что существует также высокая вероятность неспецифической адсорбции белков в сыворотке крови, что объясняется наличием свободных заряженных функциональных групп на поверхности НЧ [77]. Возможные преимущества и недостатки применения метода физической адсорбции отображены в таблице 2.

Таблица 2 – Различные стратегии синтеза биоконъюгатов антитело-наночастица методом физической адсорбции: преимущества и недостатки

Стратегия	Участвующие функциональные группы	Преимущества	Недостатки
Гидрофобные взаимодействия	Гидрофобные группы аминокислот	Простой механизм соединения между молекулами	Изменение 3D-конформации молекулы антитела, приводящее к денатурации Плохая воспроизводимость
Электростатическая адсорбция	Преимущественно NH_3^+ и COO^-	Не требует активации антител и НЧ Быстрое взаимодействие	Сильно зависит от окружающей среды и наличия заряженных групп Взаимодействия сильно зависят от pH Изменяется в зависимости от физических свойств наночастицы
Водородная связь	Донорно-акцепторные группы для образования водородной связи	Легкий Универсальный Нет необходимости модифицировать антитело	Обратимая конъюгация Плохая воспроизводимость

Из таблицы 2 видно, что физически адсорбционный подход обладает некоторыми недостатками, например, гидрофобные взаимодействия могут приводить к изменению трехмерной конформации антител, что приводит к необратимой денатурации, или антитела при длительном взаимодействии с гидрофобными наночастицами могут терять биологическую активность и тем самым приводить к снижению специфичности [78]. Однако, исследований, изучающих данные эффекты, ограниченное количество. Проведенный обзор литературы показывает, что существуют успешные примеры использования биоконъюгатов, полученных методом физической адсорбции и, несмотря на все недостатки, физическая конъюгация проста в реализации и требует минимальный расход химических реагентов.

1.6.2 Ковалентное взаимодействие

Данная стратегия предполагает образование ковалентных связей между наночастицами металлов и антителами. Конъюгаты «антитело-наночастица» преимущественно формируются путем ковалентного присоединения через концевую часть молекулы антитела (F_c), оставляя антиген связывающий фрагмент (F_{ab}) свободным для взаимодействия с желаемым антигеном [79]. Ковалентное связывание антитела к НЧ является наиболее распространенным подходом для разработки биоконъюгатов и предлагает путь для преодоления ранее описанных недостатков, связанных с физическим конъюгированием. Как правило, ковалентное взаимодействие осуществляется через различные функциональные группы, которые могут быть использованы в реакциях модификации или сшивания. Существует множество стратегий, как создать определенные функциональные группы там, где их нет, или как преобразовать одну химическую группу в другую. Ковалентное связывание антитела к НЧ через дисульфидные, сульфгидрильные функциональные группы достаточно распространено.

Дисульфидные функциональные группы ($-S-S-$) жизненно важны для функционирования многих белков, включая антитела, поскольку они являются основным компонентом в формировании и удержании третичной структуры антител через ориентацию тяжелых и легких цепных субъединиц [80]. Свободные (или специально генерируемые) сульфгидрильные группы внутри антитела могут взаимодействовать с тиол-модифицированными наночастицами, образуя дисульфидные связи [81]. Свободные сульфгидрильные группы могут быть введены в антитело путем расщепления дисульфидных связей внутри них; это обычно достигается с помощью таких восстановителей, как 2-меркаптоэтиламин, меркаптоэтанол и дитиотреитол (Рис.7).

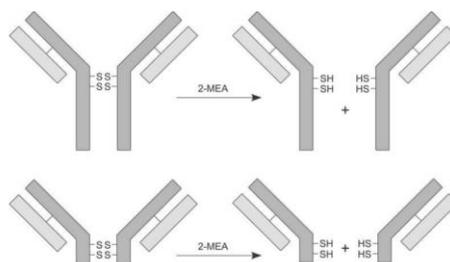


Рисунок 7 – Расщепление дисульфидных связей в шарнирной области молекул антител с использованием восстановителя 2-меркаптоэтиламина (МЕА)

Эта стратегия также приводит к образованию одноцепочечных переменных фрагментов, которые обладают большей реакционной способностью, могут быть связаны с НЧ через $-SH$ группы. Реакции тиолового связывания также являются ценным средством для обеспечения специфического присоединения антител к поверхностям. В работе [82], НЧ никеля были конъюгированы с одноцепочечным переменным фрагментом антител anti-HER2, которые избирательно взаимодействуют с внеклеточным доменом рецепторов эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2). Конъюгация происходила за счет тиоловой группы, входящей в состав цистеина. Кроме того, нами опубликована работа [83], где ковалентное взаимодействие было выбрано в качестве стратегии связывания НЧ серебра с фрагментами антител к ВКЭ. Подробный обзор стратегий конъюгации с использованием различных функциональных групп, а также протоколы получения биконъюгатов широко представлены Греггом Хермансоном [84].

Альтернативная стратегия для ковалентного взаимодействия происходит через образование амидных связей, где используют первичные функциональные группы амина, доступные на поверхности антитела. Такой подход включает несколько этапов, в том числе химическую модификацию НЧ либо путем введения функциональной группы, либо с помощью сшивающего агента (линкера). Основная причина использования образования амидной связи в качестве стратегии конъюгации обусловлена высокой плотностью и

расположением первичных аминов и групп карбоновых кислот в различных аминокислотах, которые составляют структуру антител (Рис. 8).

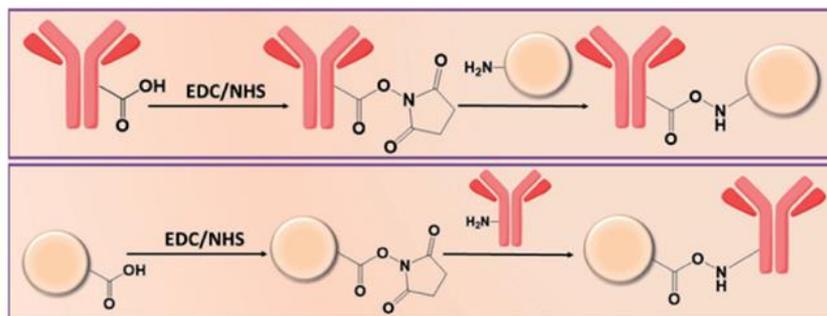


Рисунок 8 – Схематическое представление ковалентного связывания на основе EDC-NHS, приводящего к образованию амидной связи между антителами и наночастицами

Как видно из рисунка 8, ковалентная связь образуется благодаря наличию функциональных групп карбоновых кислот и аминогрупп. В большинстве случаев данные стратегии основаны на использовании 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS), которые активируют карбоксильную группу для последующего связывания первичного амина с образованием амидной связи [83]. Следует отметить, что активация кислотной группы не ограничивается использованием EDC-NHS.

В недавнем исследовании, проведенном Джазайери и соавторами [84], основное внимание было уделено разработке нового метода диагностики рака предстательной железы с использованием биоконъюгата, полученного ковалентной сшивкой. В биконъюгате НЧ золота были конъюгированы с антителом к ПСА через сшивающие агенты EDC-NHS. Конъюгация была подтверждена изменениями поверхностного плазмонного резонанса системы. В другом исследовании Райан и соавторы [85]. разработали чувствительную тест систему обнаружения патогенов с использованием наночастиц на основе диоксида кремния с оболочкой оксида железа, конъюгированных с антителами для обнаружения белка А, маркерного белка, присутствующего на поверхности золотистого стафилококка. Конъюгацию наночастица-антитело осуществляли через соединение (EDC-NHS), где модифицированные карбоновой кислотой НЧ активируются в сложный NHS-эфир с последующей реакцией с первичными

аминами, расположенными на поверхности антител. В следующей работе авторами [86] показана конъюгация антител с НЧ серебра также через образование амидных связей. В работе [86] получены биоконъюгаты на основе НЧ серебра с антителами, которые избирательно взаимодействуют с внеклеточным доменом рецепторов эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2). Активация карбоксильных групп на поверхности НЧ серебра происходила с помощью соединений EDC–NHS с последующим образованием реакционноспособных промежуточных эфиров. Одним из ограничивающих факторов для аминного связывания с использованием EDC является то, что оно может привести к самосшиванию антител, которое обусловлено присутствующими в них функциональными аминами– и карбокси– группами. Кроме того, аминное связывание может приводить к образованию антител, случайно ориентированных на поверхности НЧ, что ограничивает способность эффективно взаимодействовать с требуемым антигеном. Данное явление может быть сведено к минимуму путем тщательного контроля рН по отношению к рI антител. По этой причине были исследованы другие стратегии связывания, в том числе с использованием тиоловых связей.

Преимущества и недостатки применения ковалентного связывания, отображены в таблице 3.

Таблица 3 – Различные стратегии синтеза биоконъюгатов антитело-наночастица методом ковалентного связывания: преимущества и недостатки

Стратегия	Участвующие функциональные группы	Преимущества	Недостатки
Образование амидных связей	Карбоксильные и аминами группы	Высокоэффективность конъюгирования	Активные участки антител могут взаимодействовать с НЧ и снижать эффективность связывания антигенов Обычно требуется химическая модификация антител Вероятность самосшивания антител
Образование дисульфидных связей,	Дисульфидные и сульфгидрильные группы	Высокая стабильность полученных биконъюгатов	Обычно требуется химическая модификация антител

Обзор исследований проиллюстрировал разнообразие и универсальность подходов к конъюгации, используемых в синтезе биоконъюгатов антитело-наночастица. Потенциал применения наноматериалов в этой сфере очень велик; так как НЧ обеспечивают платформу для иммобилизации различных элементов биологического распознавания, а полученные биоконъюгаты могут быть применены в различных биомедицинских и диагностических целях.

1.7 Клещевой энцефалит. Методы диагностики

Клещевой энцефалит (КЭ) – болезнь, вызванная ВКЭ представителя рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Генетический материал вирусов представлен РНК. Людям ВКЭ передается через укусы клещей рода *Ixodes spp*, но инфицирование также может возникать при употреблении непастеризованных молочных продуктов от зараженного домашнего скота. ВКЭ широко распространён в большей части Европы, северной части Китая и Российской Федерации. Современная классификация выделяет три основных подтипа ВКЭ: европейский (ВКЭ-Ев), сибирский (ВКЭ-Сиб), дальневосточный (ВКЭ-Дв). Все подтипы тесно связаны как генетически, так и антигенно; вариация аминокислотных последовательностей между подтипами составляет 5–6%. Заражение любым подтипом наносит серьёзный вред здоровью организма человека.

Большинство случаев заражения ВКЭ происходит в теплый период года (обычно между апрелем и ноябрем), который коррелирует с периодом наибольшей активности клещей и повышенным воздействием в этот период. После укуса зараженного клеща, дендритными клетками организма происходит транспортировка вируса в региональные лимфатические узлы, где происходит дальнейшая репликация. После попадания в кровоток вирус распространяется в другие органы, в частности в ретикуло-эндотелиальную систему (главным образом, костный мозг, селезенку и печень), где вирус продолжает размножаться и поддерживать вирусемию в течение нескольких дней. Далее вирус попадает в двигательные нейроны передних рогов шейного отдела спинного мозга, клетки

мозжечка и мягкой мозговой оболочки, таким образом, поражая центральную нервную систему организма. Последствия инфицирования ВКЭ могут привести к стойким неврологическим и психиатрическим осложнениям и даже к смерти больного. Иммунизация людей является наиболее эффективной защитой от тяжёлых последствий заболевания, но несмотря на наличие вакцин, случаи заражения ВКЭ все чаще регистрируются за последние два десятилетия. Увеличение заболеваемости является результатом сложной взаимосвязи социально-экономических факторов, поскольку охват вакцинами недостаточен для многих групп риска. Другим значительным фактором роста заболеваний КЭ является глобальное изменение климата, которое приводит к увеличению численности клещей и расширению их мест обитания.

Инфекция ВКЭ вызывает иммунную реакцию клеток человеческого организма и, как следствие, начинается выработка специфических антител IgG и IgM к вирусу клещевого энцефалита. В первые дни заболевания специфические антитела IgM могут не обнаруживаться, что связано с высокой и быстро увеличивающейся выработкой специфических антител IgG. В настоящее время наиболее распространенный метод диагностики заболевания КЭ – количественное обнаружение антител IgM, IgG к ВКЭ с помощью ИФА. Принцип ИФА заключается в специфическом взаимодействии комплекса «антиген-антитело», где ферменты используются в качестве меток для обнаружения молекул-мишеней. В ИФА наибольшее распространение получил спектрофотометрический метод регистрации активности ферментов при определённой длине волны. Путем подбора условий иммобилизации антител/антигенов на твердой фазе, проведением испытаний по пригодности ферментных конъюгатов достигается необходимая чувствительность и специфичность ИФА тест-систем. Применение ферментов в качестве меток в ИФА обусловлено чрезвычайно высокой чувствительностью определения антител/антигенов при регистрации сигналов от хромогенов в присутствии определенного субстрата. Однако основным недостатком применения ферментов в конъюгатах является потеря их ферментативной активности (от 30 до 50%) во времени, а также потребность в

применении специального субстрата, обеспечивающего протекание сигналообразующей реакции. Кроме того, маркерные ферменты хранятся только при низких температурах или в консервирующих растворах. Это приводит к необходимости периодической оценки их активности и рутинным валидационным процедурам ИФА тест-систем.

Для выявления антигена ВКЭ применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) определения вирусной РНК, материалом исследования является клещ. ПЦР метод позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации (РНК) среди огромного количества других участков и многократно размножить его. Аналитическим сигналом метода является процесс образования дополнительных копий участков хромосомной РНК в реакционной смеси, в которую добавляется раствор бромистого этидия образующего с фрагментами РНК прочные соединения способные флуоресцировать под действием УФ-облучения. Кроме того, существует метод иммуно-ПЦР, где материалом исследования является кровь человека. Иммуно-ПЦР схож с форматом ИФА, однако вместо фермента для выявления комплекса антиген-антитело в нём используется фрагмент ДНК, количество которого экспоненциально увеличивается в ходе ПЦР. Данный метод имеет свои ограничения и, как правило, реже используется в клинической практике, так как вирус присутствует в крови только в начальной стадии заболевания. Иммуно-ПЦР не может быть использован во второй фазе с клиническими проявлениями КЭ [85].

Основное преимущество ПЦР состоит в том, что метод является высокочувствительным и специфическим, так как позволяет обнаруживать вирусную РНК в малых концентрациях. Однако данный метод требует приобретения дорогостоящего оборудования и реактивов, а также соблюдение особых мер предосторожности при работе с биологическим материалом и токсичными реактивами.

1.8 Перспективы применения электрохимического иммуноанализа для диагностики flavivirusных инфекций

Вирус клещевого энцефалита, вызывающий заболевание КЭ, относится к роду *Flavivirus*. По вышеупомянутым причинам в последние десятилетия наблюдается растущий интерес к разработке электрохимических иммуносенсоров для диагностики flavivirusных инфекций, благодаря их высокой чувствительности, относительно низким затратам на приобретение оборудования. Электрохимические иммуносенсоры измеряют интенсивность электрического сигнала, предоставляемого прямо или косвенно продуктами взаимодействия антитела и антигена, сочетая тем самым специфичность иммунохимической реакции с преимуществами электрохимического обнаружения. Недавние публикации подтверждают, что существует повышенный интерес к разработке электрохимических иммунологических методов диагностики flavivirusов [88–97]. В таблице 4 приведены типы электродов, модификаторов и электрохимических меток, применяемых для их определения.

Таблица 4 – Обзор электрохимических методов определения flavivirusов

Электрод	Модификатор	Метод / Метка	Мишень	Предел обнаружения	Лит.
Графитовый электрод	Глутаровый альдегид, нафтон или нитроцеллюлоза	Инверсионная вольтамперометрия / Белок А с НЧ Au	Антитела к ВКЭ	0,1 нг/см ³	[86]
Микро электрод <i>Screen-printed</i> графитовый электрод	–	Постоянно-токовая вольтамперометрия / Белок А с НЧ Ag	Антитела к ВКЭ	0,5 нг/см ³	[87]
Микро электрод <i>Screen-printed electrode</i>	нано-Au / тиоловые соединения /EDC, NHS	Электрохимическая импедансная спектроскопия / фермент (пероксидаза хрена)	Антиген Японского энцефалита	^a 167 БОЕ/см ³	[88]
Платиновый электрод	нано-Au/ <i>o</i> -фенилендиаминная полимерная пленка с нанесенной Берлинской лазурью	Амперометрия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	^a 6×10 ⁻⁹ БОЕ/см ³	[89]

Продолжение таблицы 4

Золотой дисковый электрод	L-цистеин + нано-Au and $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$	Потенциометрия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	^a $3,5 \times 10^{-8}$ БОЕ/см ³	[90]
Платиновый микроэлектрод	Полианилиновые нанопроволоки /EDC, NHS	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	10 нг/см ³	[91]
Платиновый микроэлектрод	Полианилин / многослойные углеродные нанотрубки	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	–	[92]
Микро электрод <i>Screen-printed electrode</i>	Углеродные наночастицы, модифицированные хитозаном	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	0,36 нг/см ³	[93]
Микро электрод <i>Screen-printed electrode</i>	Углеродные наночастицы /3–аминопропилтриэтоксисилан	Электрохимическая импедансная спектроскопия, циклическая вольтамперометрия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	2 нг/см ³	[94]
Микро электрод <i>Screen-printed electrode</i>	Силанизированная поверхность с белком А / глутаровый альдегид	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	Антиген Японского энцефалита	750 нг/см ³	[95]
Тонкопленочный электрод из оксида индия-олова	Нафион / ssДНК вируса Денге	Квадратно-волновая вольтамперометрия / безметочный	Антиген вируса Денге	2×10^{-18} моль/см ³	[96]
Микро электрод <i>Screen-printed electrode</i>	4-Аминобензойные кислоты / NS1 белок вируса Денге	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	Антитела к вирусу Денге	–	[97]
Микро электрод <i>Screen-printed electrode</i>	<i>n</i> -Фенилендиамин / EDC, NHS	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	Антитела к вирусу Зика	17 нг/см ³	[98]
Графеновый электрод	ПЭГ / Ti-Pt / SiO ₂	Электрохимическая импедансная спектроскопия / безметочный	NS1 белок вируса Зика	–	[99]

^a данные выражены в БОЕ на см³ (бляшкообразующая единица, отдельная инфекционная вирусная частица в суспензии вирусов, выявляемая по образованию бляшки)

Как видно из проведенного обзора литературы, большинство публикаций основано на определении антигена с использованием безметочных

импедиметрических иммуносенсоров сэндвич-формата [90–97]. В этих работах измеряется сопротивление на электроде в присутствии окислительно-восстановительных пар до и после образования комплекса «антиген-антитело» на поверхности электрода. При создании импедиметрических иммуносенсоров необходимо обращать внимание на подготовку поверхности рабочего электрода, так как от этого в значительной мере зависит точность определения аналита. Широкое применение в электроаналитической практике для определения антигена флавивирусов находят микро–электроды позволяющие работать с малыми объемами раствора, что является основным преимуществом их применения. Однако, к ключевому недостатку использования микро–электродов необходимо отнести меньшую воспроизводимость измерений. Кроме того, стоит отметить, что большинстве случаев применяются сложные и трудоемкие способы модификации микро–электродов, которые требуют больших временных и финансовых затрат для создания электрохимических иммуносенсоров.

В работах [90,93] проводят модификацию платинового и screen-printed микро–электродов с использованием EDC, NHS реагентов для активации карбоксильных групп. Как уже было сказано, применение таких реагентов может привести к самосшиванию антител, которое обусловлено присутствующими в них функциональных амино и карбокси групп.

Несколько работ направлены на диагностику КЭ, где для вольтамперометрического определения антител к ВКЭ авторы [88,89] предложили использовать коллоиды золота или серебра, конъюгированные с белком А. Применение белка А обусловлено удешевлением анализа для исключения антивидовых антител. Однако, белок А, меченный коллоидным золотом, был поставлен коммерческими компаниями, и в этом случае возможны большие затраты на проведение эксперимента. Кроме того, белок А не обеспечивает специфичность определения КЭ и может давать перекрёстные связывания при определении других флавивирусов. В работах [88,89] отсутствует информация по получению конъюгатов с коллоидами золота или серебра, что может повлиять на воспроизводимость результатов определения КЭ при закупке серебрянных и

золотых конъюгатов от партии к партии и у разных поставщиков. Кроме того, единицы измерения предлагаемых вольтамперометрических методов в работах [88,89] несопоставимы с результатами сертифицированного эталонного метода ИФА проводимого в Российской Федерации по данным 2020 года.

Стремление исследователей создать чувствительный, быстрый в приготовлении, а самое главное недорогой сенсор, приводит к разработке новых форматов электрохимических иммуносенсоров. Закономерным является необходимость использования доступных материалов электродов для иммобилизации биологического материала. В связи с этим, привлекательными становятся углеродные материалы типа графита, обладающие рядом свойств, присущих дорогостоящим наноматериалам. В то время как использование НЧ металлов в качестве меток, позволяет преодолеть недостатки применения ферментных меток.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Оборудование, электроды, ячейки, посуда

Оборудование для проведения электрохимических исследований

Электрохимические измерения проводили на вольтамперометрическом анализаторе TA-Lab (ООО «НПП Томьаналит», г.Томск, Россия), подключенного к персональному компьютеру. Анализатор содержит три электрохимические ячейки, в которых одновременно с одинаковыми условиями измерений происходит регистрация вольтамперограмм. Электрохимические ячейки представляют собой стаканчики из кварцевого стекла объемом 20 см³, в которые налит раствор электролита и опущены по три электрода: рабочий, вспомогательный и электрод сравнения. Перемешивание растворов в ячейках анализатора осуществляется с помощью вибрации рабочих электродов. Технические характеристики анализатора: воспроизводимость аналитических сигналов 1-5%; чувствительность $5 \cdot 10^{-11}$ А; продолжительность одновременного анализа трех подготовленных проб 5-30 мин.

Оборудование для анализа НЧ, биоконъюгатов и биообъектов

Спектрофотометрические исследования проводили с помощью спектрофотометра Cary 60-UV-Vis (Agilent Technologies, Германия) в кюветах из кварцевого стекла шириной 10 мм. Спектральный диапазон, в котором можно проводить измерения варьируется, от 190 до 1100 нм, с максимальной скоростью сканирования 24000 нм/мин. Спектрофотометр работает под управлением программного обеспечения Cary Win UV.

Структурные исследования НЧ серебра и биоконъюгатов проводили на просвечивающих электронных микроскопах Philips CM12 (FEI Electron Optics, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 120 кВ и JEOL JEM-2100F при ускоряющем напряжении 200 кВ (JEOL, Япония).

Фотометрические исследования проводили на спектрофотометре микропланшетного формата Thermo Scientific Multiskan FC (Финляндия). Основные характеристики: фотометр оснащен 8-позиционным колесом

светофильтров с тремя стандартными фильтрами 405, 450 и 620 нм, быстрое и точное измерение на 96-луночных планшетах в условиях меняющихся требований к пропускной способности, точность (405 нм) $\pm 1\%$ (0,3 - 3 единиц оптической плотности).

Другое вспомогательное оборудование

Взвешивание навесок проводили на аналитических весах Acculab ALC-210d4 (Sartorius Weight Technology GmbH, Германия) 1-го класса точности.

Для получения бидистиллированной применяли стеклянный дистиллятор 2304 фирмы GFL (Германия). Для получения дистиллированной воды применяли аквадистиллятор «ДЭ-4».

Синтез НЧ серебра и биоконъюгатов проводили с использованием:

- магнитной мешалки («УЛПАК. Химия в школе», Россия);
- высокоскоростной центрифуги Allegra 64R (Beckman Coulter, США);
- ультразвуковой ванны DA-968 (DADI, Китай)
- инструмента для интенсивного перемешивания образцов в микропробирках, термо-шейкер TS-100 (Biosan, Латвия).

Электрохимические ячейки и электроды

В качестве электрода сравнения и вспомогательного использовались ХСЭ, которые представляют собой спираль из серебряной проволоки, вкручиваемую в полый полипропиленовый корпус, заполненный раствором хлорида калия (1 моль/дм³). Корпус электродов закрыт полупроницаемой мембраной, изготовленной из оксида алюминия. Готовые ХСЭ хранили при комнатной температуре в стакане с раствором хлорида калия (1 моль/дм³), перед использованием ополаскивали дистиллированной водой.

В качестве рабочих электродов использовали ИГЭ (ООО «ЮМХ», Томск, Россия) и углеродсодержащий электрод (УСЭ) с обновляемой поверхностью (ООО «НПП «Томьаналит», г.Томск, Россия). УСЭ состоит из полиэтиленового корпуса, заполненного электропроводящей смесью термостабилизированного полиэтилена высокого давления (70 %) и высокодисперсного технического углерода марки N220 (30 %). Перед применением УСЭ осуществляли срезание

слоя поверхности электрода толщиной 0,3-0,5мм с помощью специального устройства для обновления поверхности УСЭ (ООО «НПП «Томьаналит», г.Томск, Россия). ИГЭ изготавливают из спектрально чистых графитовых стержней (диаметр 5 мм), пропитанных расплавленным парафином (Fluka, Москва, Россия). Перед применением очистку рабочего ИГЭ осуществляли механическим полированием на фильтровальной бумаге. Электроды хранили на воздухе. Дополнительно УСЭ, используемый в работе, подвергался модифицированию для получения золото- ансамблевой поверхности, отличающейся высокой чувствительностью. Модификацию поверхности электродов проводили путем электролиза из HAuCl_4 (1000мг/дм³), по методике: $W = 5$ [мВ/с], $t_{\text{э}}=30\text{с}$, $E_{\text{усп.и}} E_{\text{раств.}} = 0,5$ В [100].

Посуда. В работе использовалась мерная лабораторная посуда: пенициллинки объемом 10 см³, мерные колбы вместимостью 25, 50, 100, 250, 1000 см³; пробирки вместимостью 10 и 15 см³; цилиндры вместимостью 15, 50, 100 см³; микропробирки эппендорф 0,5, 1,5 и 2,0 см³; мерные пипетки объемом 2,0 и 5,0 см³; автоматические одноканальные дозаторы Thermo Scientific серии Блэк и Лайт с переменными объемами (1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 0,5-5 мл) и 8-ми канальный дозатор Thermo Scientific серии F1-ClipTip с переменным объемом 3-300 мкл (производство АО «Термо Фишер Сайентифик», г. Санкт-Петербург). Для каждого раствора использовали отдельную пипетку и сменный наконечник дозатора.

Перед проведением электрохимических исследований необходима проверка всей системы на чистоту, так как вольтамперометрический метод анализа предъявляет высокие требования к чистоте химической посуды, используемых реактивов, электродам и качеству воды. Для этого перед началом каждой серии опытов осуществляли проверку путем регистрации вольтамперограммы «холостого» опыта в растворе фонового электролита. При отсутствии посторонних пиков на вольтамперных кривых возможно сделать вывод о чистоте электрохимической системы.

2.2 Реактивы, приготовление растворов

В работе использовали следующие реактивы и стандартные вещества:

- дистиллированная и бидистиллированная вода (ГОСТ Р 52501-2005);
- азотная кислота, х.ч. (ГОСТ 4461, «Биомедхим», Россия);
- калий дигидроортофосфат, х.ч. (ГОСТ 4198-75, «Ленреактив», Россия);
- калий хлористый, х.ч. (ГОСТ 4568, «Химмед», Россия);
- калий гидроортофосфат, х.ч. (ГОСТ 2493-75, «Химмед», Россия);
- серная кислота, х.ч. (ГОСТ 4204-77, «Сигма Тек»Россия);
- калий азотнокислый (ГОСТ 4217-77, «Химмед», Россия);
- гидроксид натрия (ГОСТ 2263-79, «Химмед», Россия);
- нитрат серебра (ГОСТ 1277-75 «Химмед», Россия);
- боргидрид натрия (CAS 16940-66-2, Sigma-Aldrich, США);
- золотохлористоводородная кислота (CAS 16961-25-4, Sigma-Aldrich, США);
- 2-меркаптоэтиламин (CAS 60-23-1, Sigma-Aldrich, США);
- глутаровый альдегид (CAS 111-30-8, Sigma-Aldrich, США);
- бычий сывороточный альбумин (БСА) (CAS 9048-46-8, Sigma-Aldrich, США);
- набор реагентов «ВектоВКЭ-IgG» для иммуноферментного выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита (№ РЗН 2017/5605, Вектор-Бест, Новосибирск, Россия).

На стадиях сборки электрохимического иммуносенсора использовали промывающий раствор, содержащий: 0,1 моль/дм³ фосфатный буферный раствор рН=7,4, натрия хлорид (0,9 %), Твин —20 (0,1% от объема). Для работы с биообъектами использовали 0,1 моль/дм³ раствор фосфатного буфера (рН=7,4). Для получения желаемого значения рН к некоторому объему 0,1 моль/дм³ раствора калия гидроортофосфата приливали необходимый объем 0,1 моль/дм³ раствора калия дигидроортофосфата, приготовленных путем растворения их точной навески в дистиллированной воде. Полученные растворы хранили в

плотно закрытой полиэтиленовой или стеклянной посуде в затемненном месте при температуре не выше 25 °С. Срок хранения – 1 месяц с момента приготовления.

2.3 Объекты исследования

Электрохимический иммуноанализ по определению антител к ВКЭ проводили с использованием следующих реактивов: калибровочные образцы на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащие IgG к ВКЭ, аттестованные в наборе реагентов «Антитела к вирусу клещевого энцефалита» с концентрацией 100, 400, 1600 Ед/см³ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия).

В качестве другого объекта исследования, содержащего антитела к ВКЭ, использовали лекарственный препарат, иммуноглобулин человеческий против КЭ, ампулы по 1 мл; производитель Микроген НПО ФГУП (НПО «Вирион», Томск, Россия), титр гемагглютинирующих антител к ВКЭ не менее 1:80 и 1:160;

Для определения антител к ВКЭ в биологических жидкостях, использовали образцы сыворотки крови не содержащие IgG к ВКЭ, в которые добавляли фосфатный буфер (рН 7,4) содержащий антитела к ВКЭ (800 и 1200 Ед/см³). Образцы сыворотки крови разводили фосфатным буфером, содержащим антитела к ВКЭ в соотношении: 1 объем сыворотки и 9 объемов буфера (1:10).

Контрольные эксперименты проводили с антителами неспецифическими к антигену ВКЭ:

–калибровочный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ВКЭ (0 Ед/см³) из набора реагентов «ВектоВКЭ-IgG» для иммуноферментного выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G к ВКЭ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия);

– антитела моноклональные мышинные Anti- β -Actin (MFCD00164531, Sigma-Aldrich, США).

2.4 Методика эксперимента

2.4.1 Методика получения наночастиц серебра

НЧ серебра были получены известным методом [101] путем химического восстановления из нитрата серебра. 5 мл 1,0 ммоль/дм³ AgNO₃ медленно пипетировали (1 капля/с) в 15 мл 2,0 ммоль/дм³ NaBH₄ при интенсивном перемешивании магнитной мешалкой. Из-за высокой восстановительной способности иона боргидрида реакцию проводили при пониженной температуре (4 °С). При контроле и соблюдении всех условий, данный метод позволяет получать стабильное коллоидное серебро.

Спектр поглощения полученных растворов был измерен на спектрофотометре Cary 60 УФ-видимой области от 200 нм до 800 нм относительно деионизированной воды. Определение размера и морфологии синтезированных НЧ осуществляли методом просвечивающей электронной микроскопии. Для подготовки образцов с НЧ серебра для электронно-микроскопических исследований, несколько капель золя серебра наносятся на углеродную подложку, помещенную, в свою очередь, на специальную электронно-микроскопическую сеточку. Подготовленный таким образом образец высушивается и исследуется. Темнопольные изображения получают в дифракционных отражениях, соответствующих положению первой линии от нанокристаллов. В качестве материала подложки была выбрана медь. В результате эксперимента были составлены гистограммы распределения частиц по размеру. Полученные данные сравнивали с литературными. Перед проведением спектроскопических и электронно-микроскопических анализов суспензии образцов НЧ серебра подвергали ультразвуковому перемешиванию в течение 3-5 сек.

2.4.2 Получение биоконъюгатов на основе НЧ серебра с антителами к ВКЭ

Для проведения процесса иммобилизации антител к ВКЭ на НЧ серебра был выбран метод физической адсорбции. Биоконъюгаты «*Ab@AgNC*» получали по следующей методике: коллоидный раствор НЧ серебра (20 мл) центрифугировали в течение 10 минут при относительном центробежном ускорении 16128 г (радиус ротора 64 мм, T=4 °C). После завершения центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, а для ресуспендирования НЧ серебра использовали фосфатный буфер (8 мл, 0,1 моль/дм³, pH 7,4), содержащий антитела к ВКЭ (4,5 Ед/см³) и 16 мкг/см³ бычьего сывороточного альбумина (БСА). Ресуспендирование проводили в ультразвуковой ванне DA-968 в течение 1 минуты. После часа инкубации при 4°C с лёгким перемешиванием образцы снова центрифугировали с последующим ресуспендированием в фосфатном буфере (0,1 моль/дм³, pH 7,4).

Биологическая система, в основном требует физиологического pH (7,4), в том числе для эффективного связывания антител с НЧ серебра [102]. БСА в основном используется в качестве стабилизатора для предотвращения агрегации НЧ серебра и защиты их от коагулирующего действия электролитов [103]. Полученные биоконъюгаты состава *Ab@AgNC* хранили в плотно закрытой стеклянной посуде из затемнённого стекла при температуре 4°C не более одного месяца с момента приготовления.

Оптимальное значение концентрации антител к ВКЭ и БСА в растворе биоконъюгата подбирали определением минимальной концентрации белка, необходимой для предотвращения агрегации НЧ серебра, вызванной 10% раствором хлорида натрия и дальнейшей регистрацией величины максимума поглощения при длине волны 405 нм. Спектроскопические исследования проводили на фотометре микропланшетного формата (Thermo Scientific Multiskan FC, Финляндия). В работе использованы антиген и антитела к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG" (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия). Исследование размера, морфологии и структуры синтезированных

биоконъюгатов осуществляли методом просвечивающей электронной микроскопии.

2.4.3 Получение биоконъюгатов на основе НЧ серебра с фрагментами расщеплённых антител к ВКЭ

Получение биоконъюгатов на основе НЧ серебра с фрагментами расщеплённых антител к ВКЭ ($Ab_s@AgNC$) происходило путем расщепления дисульфидных связей внутри антител с помощью 2-меркаптоэтиламина, и с последующим ковалентным взаимодействием с НЧ серебра [84]. Для этого 500-кратный молярный избыток 2-меркаптоэтиламина добавили к 0,4 мл антител к ВКЭ (100 Ед/см³). Раствор в плотно закрытой и герметичной микропробирке эппендорф инкубировали при 37 °С в течение 90 минут. Дисульфидный восстановитель (2-меркаптоэтиламин) использовался для расщепления дисульфидных связей в шарнирной области молекул антител. После завершения реакции растворы с фрагментами расщеплённых антител к ВКЭ очищали от избытка 2-меркаптоэтиламина с помощью диализа. Для предотвращения окисления свободных сульфгидрилов буфер для проведения диализа должен содержать 1–10 ммоль/дм³ ЭДТА [24]. После очистки фрагменты расщеплённых антител к ВКЭ инкубировали с НЧ серебра. Следующие шаги аналогичны тем, что выполнялись в предыдущем разделе 2.4.2. Полученные биоконъюгаты состава $Ab@AgNC$ хранили в плотно закрытой стеклянной посуде из затемнённого стекла при температуре 4°С не более одного месяца с момента приготовления.

Исследование размера, морфологии и структуры синтезированных биоконъюгатов осуществляли методом просвечивающей электронной микроскопии.

2.4.4 Методика исследования НЧ серебра и их биоконъюгатов методом катодной инверсионной вольтамперометрии

В кварцевый стаканчик, объемом 20 см³, содержащий 10 см³ фонового электролита (0,1 моль/дм³ HNO₃ + 0,01 моль/дм³ KCl), помещали рабочий ЗАУСЭ

и два ХСЭ, один из которых использовали в качестве вспомогательного электрода, другой в роли электрода сравнения. Электрохимическую ячейку подключали к вольтамперометрическому анализатору TA-Lab. Используя метод катодной инверсионной вольтамперометрии, не менее трех раз регистрировали вольтамперограммы фонового электролита в диапазоне потенциалов 0,8 до $-0,2$ В при времени перемешивания 10 с, времени накопления 60 с, потенциале накопления $-0,6$ В, времени успокоения 5 с, скорости развертки потенциала 100 мВ/с.

После получения чистых воспроизводимых вольтамперограмм фонового электролита в электрохимическую ячейку дозатором вносили определенный объем исследуемого раствора и проводили съемку вольтамперограмм восстановления НЧ серебра.

2.4.5 Методика исследования НЧ серебра и их биоконъюгатов методом анодной инверсионной вольтамперометрии

В кварцевый стаканчик, объемом 20 см³, содержащий 10 см³ фонового электролита (0,1 моль/дм³ HNO₃ + 0,01 моль/дм³ KCl), помещали рабочий ИГЭ и два ХСЭ, один из которых использовали в качестве вспомогательного электрода, другой в роли электрода сравнения. Электрохимическую ячейку подключали к вольтамперометрическому анализатору TA-Lab. Используя метод анодной вольтамперометрии не менее трех раз регистрировали вольтамперограммы фонового электролита в диапазоне потенциалов 0,0 до 0,6 В при времени перемешивания 10 с, времени накопления 60 с, потенциале накопления $-0,6$ В, времени успокоения 5 с, скорости развертки потенциала 100 мВ/с.

После получения чистых воспроизводимых вольтамперограмм фонового электролита в электрохимическую ячейку дозатором вносили определенный объем исследуемого раствора и проводили съемку вольтамперограмм окисления НЧ серебра.

2.4.6 Методика сборки электрохимического иммуносенсора

Методика иммобилизации антигена ВКЭ

В качестве подложки для иммобилизации биологического материала использовались ИГЭ. Выбор ИГЭ обусловлен высокой электроактивной площадью поверхности, механической прочностью и отсутствием пористости электрода. Иммобилизация антигена ВКЭ осуществлялась в несколько этапов и представлена на рисунке 9.

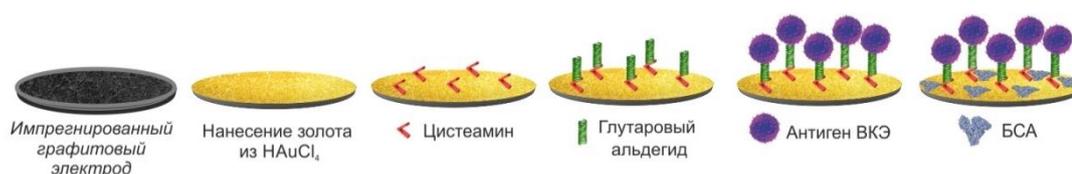


Рисунок 9 – Многоэтапность процедуры иммобилизации антигена ВКЭ

На первом этапе НЧ золота электрохимически осаждали на поверхность ИГЭ из раствора HAuCl_4 (1000 мг/дм^3). Затем электрод был предварительно электрохимически обработан с помощью метода циклической вольтамперометрии в растворе $0.5 \text{ моль/дм}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ (потенциалы циклирования от $-1,5$ до $+1,5$) до получения воспроизводимых циклических вольтамперограмм [104]. На следующем этапе проводили тиолирование поверхности электрода путем погружения в 2 мл раствора цистеина ($0,05 \text{ моль/дм}^3$) в течение 45 минут при комнатной температуре. После промывки электрода деионизированной водой электрод помещали в раствор глутарового альдегида (2,5%) на 45 минут при комнатной температуре. Бифункциональный реагент глутаровый альдегид использовался для ковалентного связывания антигена ВКЭ. После этого электрод трижды промывали фосфатным буфером (ФБ (pH 7,4)) для удаления избытка глутарового альдегида и иммобилизовали на поверхности электрода антиген объемом 20 мкл (набор реагентов «ВектоВКЭ-IgG» Новосибирск, Россия). Время инкубации электрода составляло 1 час при температуре $24-26 \text{ }^\circ\text{C}$. Затем электрод промывали трижды ФБ (pH 7,4) для удаления избытка антигена ВКЭ и погружали

в раствор БСА (1%) на 30 минут с целью блокирования участков неспецифического связывания [20]. Полученный электрод с иммобилизованным антигеном ВКЭ на поверхности электрода хранили при температуре 4°C в течение 6 месяцев.

Методика сборки электрохимического иммуносенсора и варианты обнаружения антител к ВКЭ

После иммобилизации антигена ВКЭ электрод помещали в раствор антител к ВКЭ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) на 1 час при 37 °С. Концентрации антител к ВКЭ были от 50 до 1600 Ед/см³. После того, как несвязанные компоненты были удалены промывкой ФБ (рН 7,4), анализ проводили с различными типами биоконъюгатов (*Ab@AgНЧ*, *Abs@AgНЧ*). Электрод помещали в раствор биоконъюгата в течение 1 часа (37 °С). После этого электрод трижды промывали ФБ (рН 7,4). Дальнейшее исследование по обнаружению антител к ВКЭ было основано на измерении электрохимического сигнала от серебра в биоконъюгатах методами анодной / катодной вольтамперометрии (Разделы 2.4.4 и 2.4.5). Необходимо отметить, что регистрацию сигнала вели на другом электроде.

Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа *Ab@AgНЧ*, где электрохимическое обнаружение НЧ серебра осуществляется посредством твердофазного процесса $Ag/AgCl$ методом катодной инверсионной вольтамперометрии на поверхности ЗАУСЭ представлено на рисунке 10.

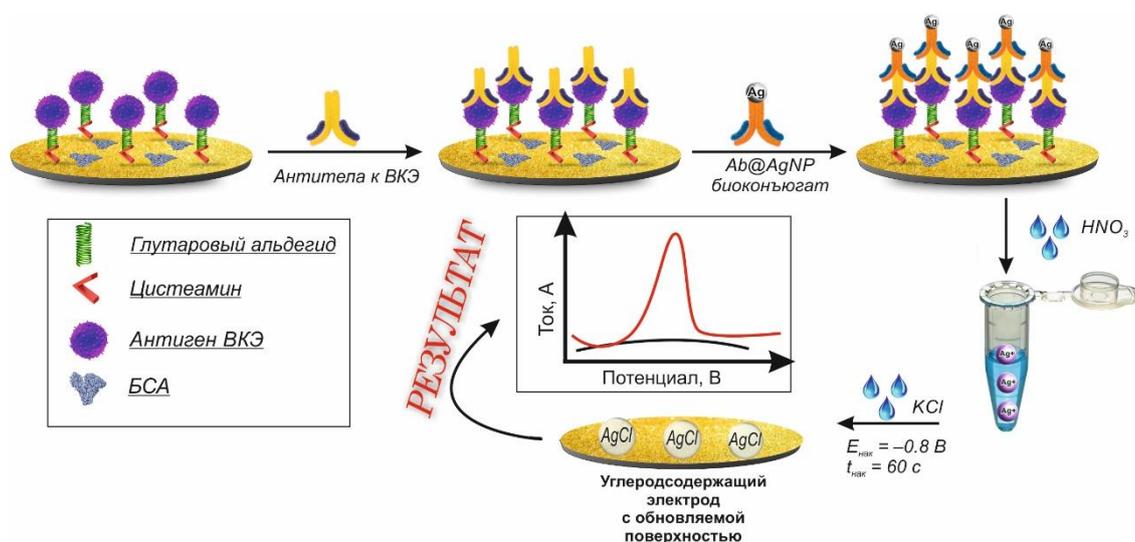


Рисунок 10 – Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Ab@AgНЧ$

Другой вариант сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Abs@AgНЧ$ представлен на рисунке 11, где электрохимическое обнаружение НЧ серебра осуществляется методом анодной инверсионной вольтамперометрии, включающей этап катодного осаждения ионов серебра на поверхности ИГЭ с последующим его высвобождением.

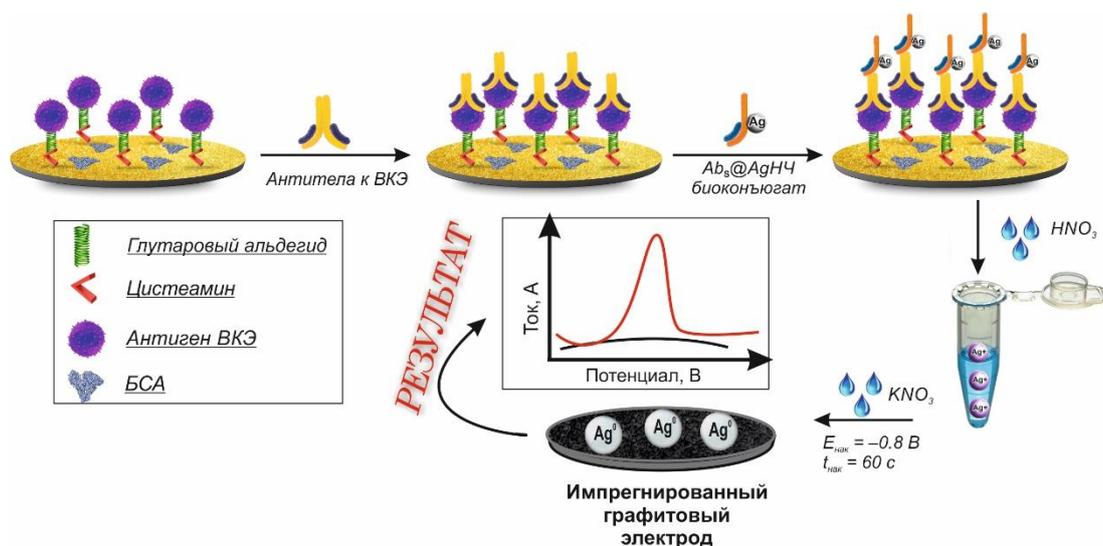


Рисунок 11 – Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Abs@AgНЧ$

Контрольные эксперименты по исключению неспецифического взаимодействия включали те же этапы получения электрохимического иммуносенсора, за исключением иммобилизации антигена; вся поверхность была заблокирована БСА. Кроме того, на этапе образования комплекса «антиген–антитело» применялись моноклональные мышинные антитела Anti- β -Actin (Sigma-Aldrich, США) не специфичные к антигену ВКЭ.

2.4.7 Методика определения антител к ВКЭ вольтамперометрическим методом анализа

Метод катодной инверсионной вольтамперометрии

Электрохимический иммуносенсор, на поверхности которого образован комплекс антиген-антитело, предварительно погружали в 1 см³ HNO₃ (1 моль/дм³) в течение 15 минут. Раствор доводили до объема 10 см³, где концентрация хлорид ионов составила 0,01 моль/дм³, регистрацию сигнала вели на другом электроде. Для работы собирали трехэлектродную ячейку, состоящую из рабочего ЗАУСЭ и двух ХСЭ, применяемых в качестве вспомогательного и электрода сравнения. Рабочие условия описаны в разделе 2.4.4.

Метод анодной инверсионной вольтамперометрии

Электрохимический иммуносенсор, на поверхности которого образован комплекс антиген-антитело, также предварительно погружали в 1 см³ HNO₃ (1 моль/дм³) в течение 15 минут. Раствор доводили до объема 10 см³ раствором 0,5 моль/дм³ KNO₃, регистрацию сигнала ввели на другом электроде. В случае измерения электрохимического сигнала окисления серебра в качестве рабочего электрода был выбран ИГЭ. Рабочие условия описаны в разделе 2.4.5.

2.4.8 Методика определения антител к ВКЭ методом ИФА

Для определения антител к ВКЭ использовали коммерческий набор реагентов «ВектоВКЭ-IgG» (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) для проведения

непрямого гетерогенного ИФА. Иммунизацию биологического материала (100 мкл) проводили в лунках микротитровальных планшетов с иммобилизованным антигеном ВКЭ. Для постановки количественного анализа использовали калибровочные образцы антител из набора «ВектоВКЭ-IgG». Концентрации антител к ВКЭ в калибровочных образцах были следующими (Ед/см³): 100, 400, 1600. Инкубирование биологического материала и калибровочных образцов антител к ВКЭ производили в течение 60 мин. при 37 °С. По окончании инкубации, с помощью промывочного раствора осуществляли пятикратную промывку планшета. После этого во все лунки планшета было внесено 100 мкл конъюгата (антитела к ВКЭ меченные пероксидазой хрена). Реакцию проводили в течение 60 мин. при 37 °С. По окончании реакции с помощью промывочного раствора промывали планшет пять раз. Затем вносили во все лунки планшета 100 мкл 0,1 моль/дм³ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), содержащего пероксид водорода (0,01%) для образования окрашенного комплекса. Планшет инкубировали при 25 °С в течение 30 минут, реакция была остановлена добавлением 0,1 моль/дм³ H₂SO₄. Произошедшая цветовая реакция пропорциональна предшествующей иммунологической. Изменение цвета контролировали спектрофотометрически в лунках планшета для микротитрования с использованием микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) при длине волны 450 нм относительно деионизированной воды. По полученным значениям оптической плотности стандартных образцов антител к ВКЭ различной концентрации была построена калибровочная зависимость с диапазоном линейности от 100 до 1600 Ед/см³. Концентрация антител к ВКЭ в биологических объектах вычислялась методом градуировочного графика.

2.5 Статистическая обработка результатов

Заключительной и важной стадией при разработке новых методик и подходов является статистическая обработка результатов измерений, которая дает возможность оценить погрешности измерений (случайные, систематические) и основные метрологические характеристики метода. На основании нормативных документов ГОСТ Р 5725-1-2002 и ГОСТ Р 5725-6-2002 можно сделать вывод, что точность химического анализа описывается через нахождение прецизионности (воспроизводимости), правильности и точности.

Прецизионность описывает степень близости независимых результатов измерений друг к другу, полученных в конкретных установленных условиях. Данная характеристика зависит только от случайных факторов и никак не связана с истинным или условно истинным значением измеряемой величины.

Правильность характеризуется степенью близости среднего значения, полученного на основании серии результатов измерений, к истинному или принятому опорному значению. Показателем правильности обычно является значение систематической погрешности.

Точность – это понятие описывает суммарное отклонение результата от опорного значения, вызванное как случайными, так и систематическими причинами.

Опорное или эталонное значение – общепринятая согласованная величина, в качестве которой могут выступать: теоретическое или научно установленное значение; аттестованное значение; аттестованное значение смеси; математическое ожидание измеряемой характеристики, т.е. среднее значение заданной совокупности результатов анализа.

Стоит отметить, что в зависимости от факторов, оказывающих влияние на результат химического анализа (время анализа, калибровочная зависимость, оператор, оборудование, температура и давление окружающей среды) выделяют: прецизионность анализа в условиях повторяемости (один оператор, методика, оборудование, практически одновременно – параллельное определение);

внутрилабораторная прецизионность анализа (одна методика, оборудование, лаборатория и разные время, оператор партии реактивов), прецизионность анализа в условиях воспроизводимости (одна методика, разные лаборатории оператор, условия окружающей среды).

Прецизионность оценивается среднеквадратичным отклонением (СКО): σ_r - СКО повторяемости; σ_R - СКО воспроизводимости; $\sigma_{Rл}$ - СКО внутрилабораторной прецизионности.

ГЛАВА 3. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ БИОКОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Подготовка электрохимического иммуносенсора включает в себя стадию получения электроактивных биоконъюгатов. Для этих целей в качестве элементов распознавания были выбраны антитела к ВКЭ и фрагменты расщепленных антител к ВКЭ, которые конъюгировали с НЧ серебра. Природа взаимодействия между НЧ серебра и антителами очень сложна и зависит от ряда факторов: размера НЧ, рН среды, типа и молекулярной массы белка. Чувствительность электрохимического иммуносенсора напрямую зависит от синтезированных биоконъюгатов, где НЧ серебра является электрохимической меткой. В этой связи немаловажно уделять внимание к выбору стратегий получения электроактивных биоконъюгатов.

3.1 Характеристика полученных НЧ серебра и их биоконъюгатов

НЧ серебра были получены путем химического восстановления из нитрата серебра, методика описана в работе [101]. На рисунке 12 представлен спектр поглощения полученных НЧ серебра.

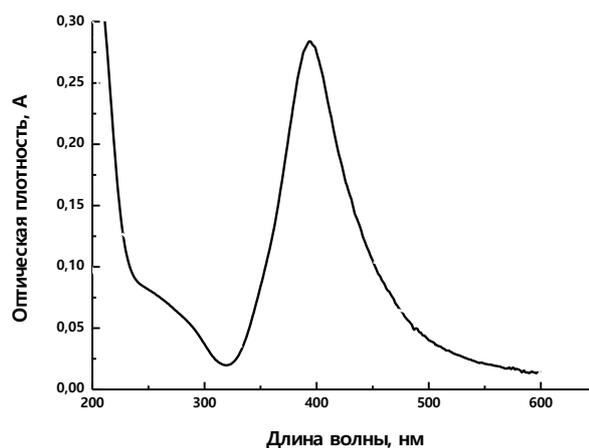


Рисунок 12 – Спектр поглощения НЧ серебра. $C(\text{AgNO}_3) = 1 \text{ ммоль/дм}^3$, длина оптического пути 1 см, растворитель – деонизированная вода

Исследование размера и формы полученных НЧ проводилось методом

просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 13) по методике, представленной в разделе 2.4.1.

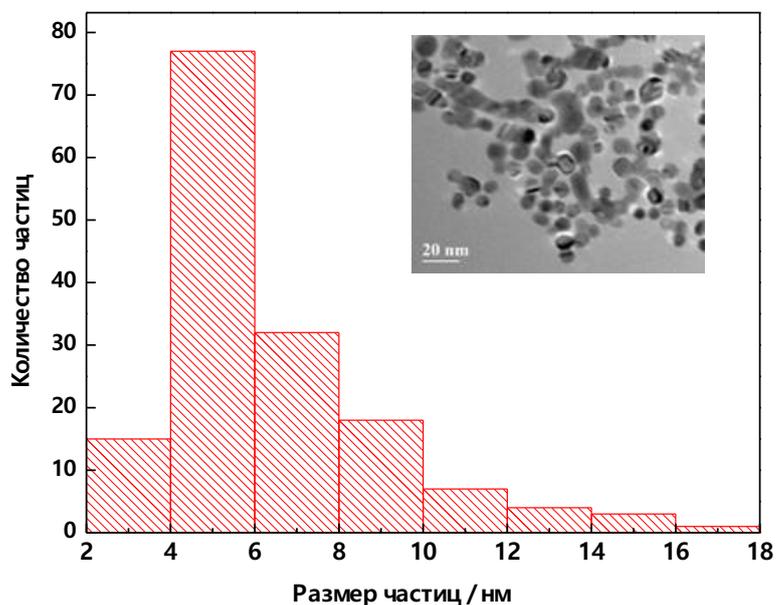


Рисунок 13 – Распределение НЧ серебра по размерам и изображение ПЭМ

Биоконъюгаты серебряных НЧ с антителами к ВКЭ получали методами физической адсорбции ($Ab@AgНЧ$) и ковалентного взаимодействия ($Ab_s@AgНЧ$) (Разделы 2.4.2 и 2.4.3).

Получение биоконъюгатов $Ab@AgНЧ$ осуществлялось посредством простого смешивания двух растворов коллоидного серебра и антител к ВКЭ, без использования дополнительных химических реагентов. Антитела к ВКЭ имеют белковое происхождение и могут выступать в роли стабилизаторов для предотвращения агрегации НЧ серебра, защищая их от коагулирующего действия электролитов [103]. Для определения оптимальной концентрации антител, при которой проявляется их защитная способность от коагулирующего действия хлорида натрия в отношении синтезированных НЧ серебра со средним размером $5,3 \pm 1,2$ нм, проводилась их в диапазоне концентраций 1600–0,5 Ед/см³ по 10 мкл в лунках микротитровального планшета в присутствии НЧ серебра (100 мкл) с последующим добавлением избытка раствора хлорида натрия (10%, 100 мкл).

Уменьшение оптической плотности при длине волны 405 нм, изменение окраски полученных биоконъюгатов после добавления избытка раствора хлорида натрия (10%, 100 мкл), может указывать на недостаточную концентрацию антител для защиты НЧ серебра от коагулирующего действия хлорида натрия. Методом спектрофотометрии было подобрано оптимальное содержание антител к ВКЭ [4,5 Ед/см³] в растворе НЧ серебра [1 ммоль/дм³ AgNO₃] со средним размером коллоидной частицы $5,3 \pm 1,2$ нм. Стоит отметить, что необходимое соотношение концентрации антител к НЧ серебра для успешной стабилизации коллоида может зависеть от ряда факторов, таких как дисперсии НЧ по размерам, метод синтеза НЧ, природа восстановителя, тип антител. Оценку влияния перечисленных параметров следует проводить с учетом конкретных задач исследования перед иммуноэлектрохимическими измерениями.

Полученные биоконъюгаты (*Ab@AgНЧ*, *Abs@AgНЧ*) были исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии (Рис.14).

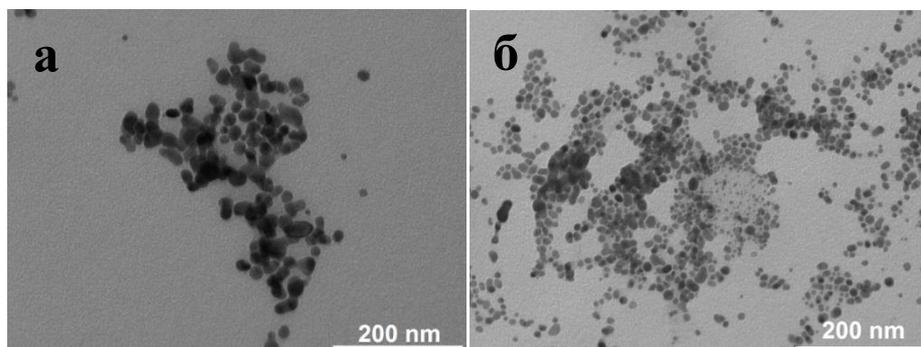


Рисунок 14 – Изображения ПЭМ биоконъюгатов (а) *Ab@AgNP*, (б) *Abs@AgNP*

Как показано на рисунке 14, морфология биоконъюгатов *Ab@AgНЧ* и *Abs@AgNP* очень схожа и представлена темными скоплениями сферических образований НЧ серебра в присутствии белковых молекул (антител к ВКЭ, фрагменты расщепленных антител к ВКЭ). Как было уже сказано в разделе 1.6, возможны различные типы взаимодействия НЧ серебра с белковыми молекулами. В случае синтеза биоконъюгата *Ab@AgNP* механизм конъюгирования основывается на силах притяжения (Ван-дер-Ваальсовых силах), водородных связях, гидрофобных и электростатических взаимодействиях. В случае другого

биоконъюгата *Abs@AgNP* дисульфидные связи селективно восстанавливались с образованием активных сульфгидрильных групп, с которыми ковалентно связываются НЧ серебра. [105,106]. Следовательно, в случае расщепления дисульфидных связей антител к ВКЭ, наблюдается большее количество НЧ серебра в составе конъюгатов *Abs@AgNP* по сравнению с *Ab@AgNP* в соответствии с рисунком 14. Антиген активные сайты связывания антител не должны блокироваться реагентами модификации или последующими стадиями конъюгации. 2-Меркаптоэтиламин был использован для расщепления дисульфидов в основном в шарнирной области антител - вдали от сайтов связывания, таким образом, сохраняя дисульфидную часть, которая удерживает тяжелые и легкие цепи вместе [107]. Для определения применимости полученных биоконъюгатов в электрохимическом иммуноанализе реальных объектов проведены эксперименты по апробации биоконъюгатов *Abs@AgNP*, *Ab@AgNP* в качестве электроактивных элементов распознавания.

3.2 Электрохимические исследования НЧ серебра и их биоконъюгатов

Одной из задач работы являлась возможность использования полученных биоконъюгатов для разработки электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ (Ig G), работающего в формате твердфазного непрямого неконкурентного иммуноанализа, где НЧ серебра выступают в качестве сигналообразующих меток. Анализ литературы позволяет сделать вывод, что за последние два десятилетия основное внимание авторов по определению НЧ серебра с использованием электрохимических методов анализа сосредоточено на применении метода инверсионной вольтамперометрии. Большой интерес с научной и прикладной точек зрения в рамках настоящего исследования представляет метод обнаружения серебряной метки биоконъюгатов посредством химического растворения НЧ серебра в кислой среде до ионного состояния с последующим катодным осаждением серебра на поверхности электрода и регистрацией сигнала окисления серебра методом анодной инверсионной вольтамперометрии (АИВ). Другим перспективным подходом является метод

обнаружения серебряной метки биоконъюгатов посредством твердофазного накопления $\text{AgCl}\downarrow$ на поверхности электрода, где ионное серебро, полученное после химического растворения НЧ серебра, связывается с хлорид ионами из водного раствора электролита, содержащим KCl . Электрохимическое определение осуществляется методом катодной инверсионной вольтамперометрии (КИВ).

Настоящая глава посвящена исследованию электрохимических свойств НЧ серебра и их биоконъюгатов и выявлению наиболее подходящих условий для электрохимического обнаружения серебра в биоконъюгатах методами инверсионной вольтамперометрии.

3.2.1 Исследование электрохимических свойств НЧ серебра на электроде с обновляемой поверхностью

На первом этапе был подобран наиболее оптимальный метод для определения НЧ серебра на электроде с обновляемой поверхностью, который представляет собой УСЭ, заполненный смесью полиэтилена (70%) и углерода (30%), где токопроводящей составляющей является только углерод. В этой связи для увеличения электроактивной площади поверхности УСЭ был модифицирован золотом по методике, представленной в разделе 2.1. Эффективность модификации поверхности электрода оценивалась методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. На рисунке 15 представлены ЦВА $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ на электроде до модификации золотом и после.

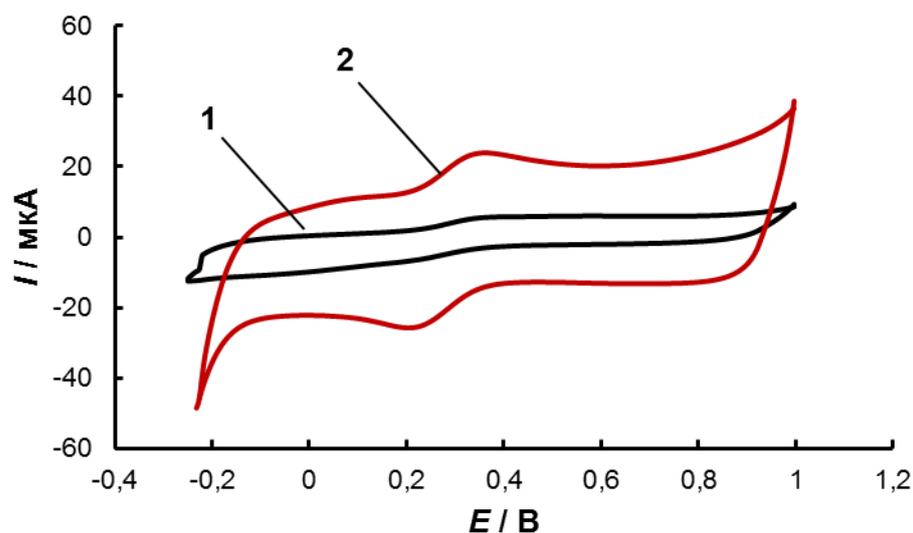


Рисунок 15 – Циклические вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ($c=0,5$ ммоль/дм³) в фоновом электролите 0,1 моль/дм³ KCl до(1)и после (2) модификации УСЭ золотом; $W= 0,05$ В/с

Таким образом, с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ показано, что поверхность УСЭ была успешно модифицирована золотыми частицами. Далее было проведено сравнительное исследование электрохимических свойств НЧ серебра методами КИВ и АИВ на ЗАУСЭ. Хлоридсеребряные электроды использовали в качестве вспомогательного и электрода сравнения. Вольтамперограммы окисления НЧ серебра были записаны в области потенциалов от $-0,2$ В до $0,6$ В. Вольтамперограммы восстановления НЧ серебра были записаны от $0,6$ В до $-0,2$ В. Все измерения проводились со скоростью развертки 100 мВ/с, время накопления 60 с, потенциал накопления $-0,6$ В в различных фоновых электролитах, содержащих $0,01$ ммоль/дм³ НЧ серебра в пересчете на Ag^+ . Полученные результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Разные подходы инверсионного вольтамперометрического определения НЧ серебра с использованием ЗАУСЭ

Способ регистрации сигнала	Инверсионная стадия электродного процесса	Фоновый электролит, моль/дм ³	Значение потенциала аналитического сигнала, В	<i>I</i> Сигнал / <i>I</i> Шум	Ток, мкА	Дисперсия воспроизводимости сигнала $P=0,95, n=5$
КИВ	Накопление – AgCl↓	0,1 HNO ₃ + 0,01 KCl	$E_{пк}=0,10$	85	-0,45	0,106
АИВ	Накопление – Ag ⁰	0,1 HNO ₃ + 0,5 KNO ₃	$E_{па}=0,25$	72	0,25	0,085

Анализируя данные, представленные в таблице 5, можно сделать вывод, что в случае использования ЗАУСЭ для последующих исследований по вольтамперометрическому определению НЧ серебра, необходимо применять метод КИВ (обнаружение через труднорастворимое соединение AgCl↓) ввиду большей чувствительности регистрации аналитического сигнала от НЧ серебра в выбранных условиях.

3.2.2 Исследование электрохимических свойств НЧ серебра на ИГЭ

В качестве следующего электрода для исследований электрохимических свойств НЧ серебра было предложено использовать ИГЭ. Данный электрод получают пропиткой водоотталкивающим материалом (парафином), что приводит к снижению емкостных токов и препятствует диффузии электроактивных компонентов вглубь электрода. Процент токопроводящей составляющей в ИГЭ составляет 70%. По этой причине ИГЭ не подвергался модификации золотом. Перед применением очистку рабочего ИГЭ осуществляли механическим полированием на фильтровальной бумаге.

Как и в разделе 3.2.1 было проведено сравнительное исследование электрохимических свойств НЧ серебра методами КИВ и АИВ с использованием ИГЭ. Условия описаны в разделе 3.2.1. Полученные результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Разные подходы инверсионного вольтамперометрического определения НЧ серебра с использованием ИГЭ

Способ регистрации сигнала	Инверсионная стадия электродного процесса	Фоновый электролит, моль/дм ³	Значение потенциала аналитического сигнала, В	<i>I</i> Сигнал / <i>I</i> Шум	Ток, мкА	Дисперсия воспроизводимости сигнала <i>P</i> =0,95, <i>n</i> =5
КИВ	AgCl↓	0,1 HNO ₃ + 0,01 KCl	<i>E</i> _{пк} =0,10	35	-0,03	0,106
АИВ	Ag ⁰	0,1 HNO ₃ + 0,5 KNO ₃	<i>E</i> _{па} =0,30	98	0,11	0,074

На основании данных, представленных в таблице 6, можно сделать вывод, что для регистрации чувствительного и воспроизводимого аналитического сигнала от НЧ серебра, в качестве электрохимической метки на ИГЭ необходимо использовать способ АИВ.

Таким образом, в случае использования ЗАУСЭ предпочтительнее является способ КИВ регистрации сигнала от НЧ серебра, где инверсионной электродной стадией является накопление фазы AgCl↓ на поверхности электрода. В случае использования ИГЭ предпочтительнее является способ АИВ регистрации сигнала от НЧ серебра, где инверсионной электродной стадией является накопление фазы Ag⁰.

3.2.3 Выбор рабочих условий определения НЧ серебра на ЗАУСЭ и ИГЭ методами инверсионной вольтамперометрии

Инверсионная вольтамперометрия является уникальным вольтамперометрическим методом количественного определения аналитов. Как правило, включает в себя два основных этапа: (1) этап накопления, роль которого заключается в концентрации аналитов на поверхности электрода; (2) этап обнаружения, во время которого происходит обратная реакция первого этапа. Благодаря стадии предварительного концентрирования, инверсионная вольтамперометрия демонстрирует более высокую чувствительность относительно других методов. Для разработки методики количественного

определения НЧ серебра необходимо исследовать влияние различных факторов на электрохимический сигнал: условия растворения НЧ серебра, состав фонового электролита, время и потенциал накопления.

Влияние условий химического растворения НЧ серебра на электрохимический сигнал

Принцип обнаружения антител к ВКЭ основан на предварительном растворении НЧ серебра биоконъюгатов в кислом растворе (Рис. 10, 11). Перевод НЧ серебра в ионное состояние способствует облегчению инверсионных стадий накопления твердых осадков серебра при различных вольтамперометрических способах регистрации аналитических сигналов на ЗАУСЭ и ИГЭ. В ходе предварительных экспериментов было замечено, что электрохимический сигнал НЧ серебра зависит от типа используемого растворяющего реагента. Для этого было проверено влияние условий растворения с использованием HNO_3 и H_2O_2 [108,109]. На рисунке 16а показано, что наибольший ток был получен при растворении НЧ серебра в растворе 1 моль/дм³ HNO_3 , использование более концентрированного раствора азотной кислоты (2 моль/дм³) не влияло на электрохимический сигнал серебра. В качестве примера на рисунке 16б показана типичная анодная вольтамперограмма серебра, полученная после растворения НЧ серебра в 1 моль/дм³ HNO_3 .

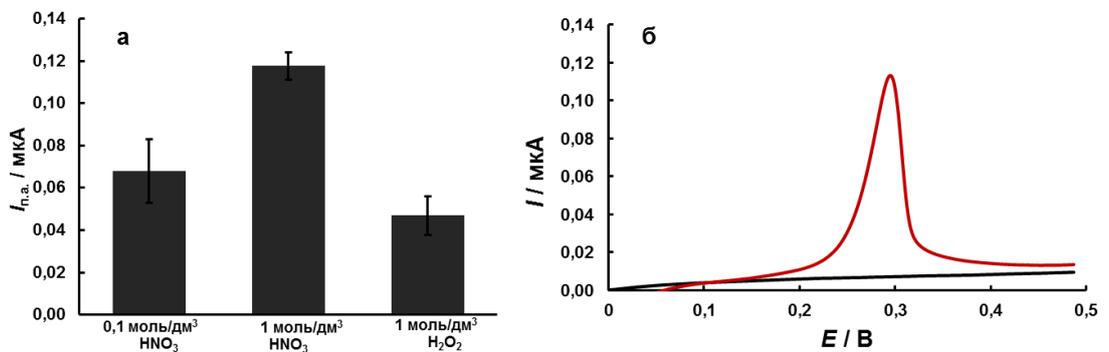


Рисунок 16 – (а) Сравнение токов окисления серебра от типа используемых растворяющих реагентов НЧ серебра на ИГЭ, (б) Анодная вольтамперограмма серебра ($C_{\text{НЧ}} = 0,01$ ммоль/дм³) на ИГЭ в 0,1 моль/дм³ HNO_3 и 0,5 моль/дм³ KNO_3 ,

кривая черного цвета представляет собой фоновый электролит, $W=0,1$ В/с, $E_{\text{нак}} = -0,6$ В, $t_{\text{нак}} = 60$ с

Для дальнейших исследований в качестве наилучшего реагента для растворения НЧ серебра была выбрана 1 моль/дм³ HNO₃.

В случае электрохимического детектирования НЧ серебра способом КИВ, в котором инверсионной стадией является накопление фазы AgCl↓ на поверхности электрода, очень важным параметром для работы был подбор концентраций хлорид ионов в фоновом электролите. В таблице 7 представлены данные влияния концентрации хлорид ионов фонового электролита на интенсивность катодного тока серебра, где наиболее подходящей для работы является концентрация KCl $0,01$ моль/дм³.

Таблица 7 – Влияние концентрации хлорид ионов фонового электролита на ЗАУСЭ при $E_{\text{нак}} = -0,6$ В на интенсивность катодного тока серебра

Концентрация KCl, моль/дм ³	$t_{\text{нак}}$, МИН	I , мкА
$1 \cdot 10^{-2}$	1,0	-0,465
$1 \cdot 10^{-3}$	1,0	-0,248
$1 \cdot 10^{-4}$	1,0	-0,121
$1 \cdot 10^{-5}$	1,0	-0,073

Влияние потенциала и времени накопления

В связи с тем, что электрохимические сигналы от НЧ серебра связаны с накоплением AgCl↓ или Ag⁰ на поверхностях ЗАУСЭ и ИГЭ, необходимо было подобрать такие параметры, как потенциал ($E_{\text{нак}}$) и время накопления ($t_{\text{нак}}$), которые способствуют наиболее полному переводу аналита в соответствующую твердую фазу.

При выборе потенциала накопления исследовали область значений от $0,4$ В до $-1,0$ В методом КИВ при содержании НЧ серебра в электрохимической ячейке $0,01$ ммоль/дм³. Интенсивность сигнала от НЧ серебра увеличивается при переходе от положительной к отрицательной области. Из графика зависимости

тока электровосстановления серебра из $\text{AgCl}\downarrow$ от потенциала накопления на ЗАУСЭ видно, что после $E_{\text{нак}} = -0,6\text{В}$ зависимость выходит на предел (Рис. 17).

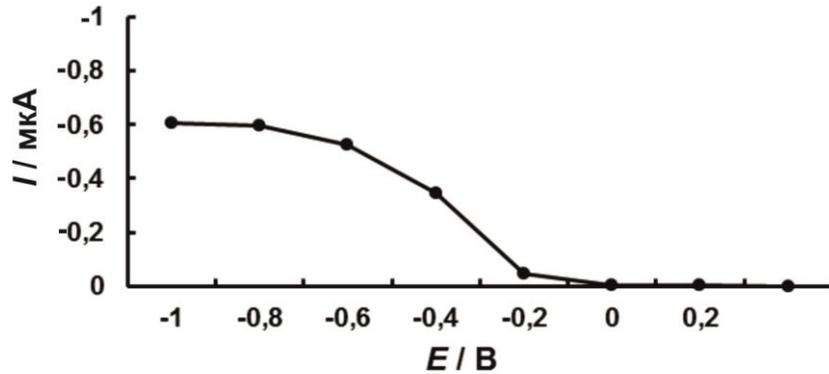


Рисунок 17 – Величина катодного тока серебра ($C_{\text{НЧ}} = 0,01$ ммоль/дм³) при различном потенциале накопления $\text{AgCl}\downarrow$ на ЗАУСЭ; Фоновый электролит – (0,01 моль/дм³ KCl + 0,1 моль/дм³ HNO_3); $t_{\text{нак}} = 1$ мин.; $W = 0,1$ В/с

Для процесса электроокисления Ag^0 на ИГЭ была получена аналогичная зависимость, предел которой достигается при $E_{\text{нак}} = -0,6$ В. Полученные экспериментальные данные хорошо согласуются с литературными [81]. Для дальнейших исследований использовали потенциал накопления $-0,6$ В.

Следующим этапом было исследование влияния времени накопления (от 0 до 60 с.) на аналитический сигнал серебра при выбранном потенциале накопления $-0,6$ В. При увеличении времени накопления до 60 с. наблюдается рост интенсивности электрохимического сигнала как для процесса электроокисления Ag^0 , так и для процесса электровосстановления серебра из $\text{AgCl}\downarrow$, который при последующем увеличении времени изменяется незначительно (Рис. 18).

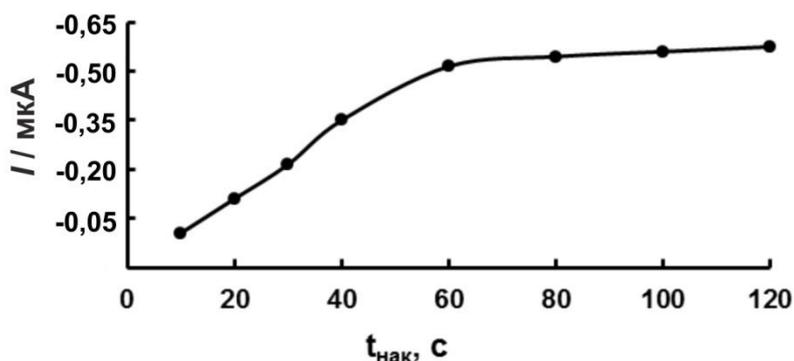


Рисунок 18 – Величина катодного тока серебра ($C_{\text{НЧ}} = 0,01$ ммоль/дм³) при различном времени накопления $\text{AgCl}\downarrow$ на ЗАУСЭ; Фоновый электролит – (0,01 моль/дм³ $\text{KCl} + 0,1$ моль/дм³ HNO_3); $E_{\text{нак}} = -0,6$ В; $W = 0,1$ В/с

Таким образом, в данной главе выбраны рабочие условия регистрации аналитического сигнала серебра НЧ на ЗАУСЭ и ИГЭ методами инверсионной вольтамперометрии. Для перевода НЧ серебра в ионное серебро предложено использовать 1 моль/дм³ HNO_3 , которая входит в состав фоновых электролитов двух процессов – электровосстановления серебра из $\text{AgCl}\downarrow$ на ЗАУСЭ и электроокисления Ag^0 на ИГЭ. Определена концентрация хлорид ионов в ячейке – 0,01 моль/дм³ для электровосстановления серебра из $\text{AgCl}\downarrow$ на ЗАУСЭ. Съёмку вольтамперограмм проводят при скорости развертки 100 мВ/с. Потенциал накопления соответствует $-0,6$ В. Время накопления соответствует 60 с. Данные условия приняты для определения, как НЧ серебра, так и биоконъюгатов в электрохимической ячейке.

Как уже было отмечено, в настоящей работе НЧ серебра, связанные с антителами к ВКЭ, сначала растворяются в HNO_3 , чтобы высвободить ионы Ag^+ , которые впоследствии обнаруживаются методом инверсионной вольтамперометрии.

Именно благодаря стадии электрохимического накопления серебра биоконъюгатов, возможно, достичь меньший предел обнаружения антител к ВКЭ. На рис. 19 показаны примеры вольтамперограмм окисления серебра на ИГЭ от концентрации НЧ серебра в растворе.

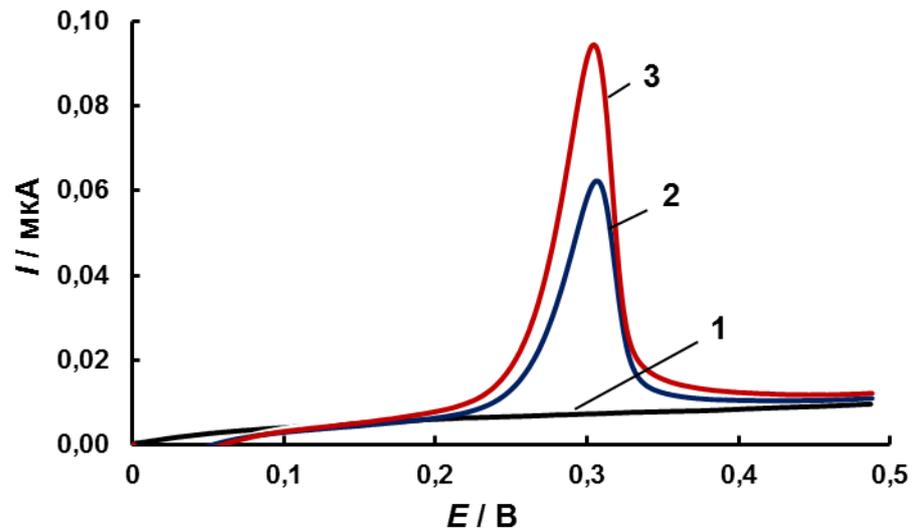
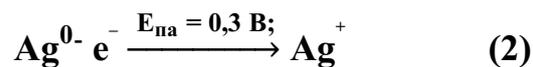
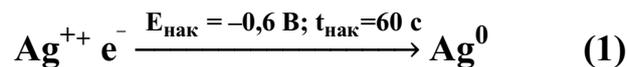


Рисунок 19 – Анодные вольтамперограммы серебра на ИГЭ в фоновом электролите (1 – 0,5 моль/дм³ KNO₃ + 0,1 моль/дм³ HNO₃); 2 – НЧ серебра (1 мкмоль/дм³); 3 – НЧ серебра 10 мкмоль/дм³) $W=0,1$ В/с, $E_{\text{нак}} = -0,6$ В, $t_{\text{нак}}=60$ с

Наночастицы серебра предварительно растворяли в 1 моль/дм³ растворе HNO₃ и вводили в электрохимическую ячейку с раствором KNO₃ (0,05 моль/дм³), регистрацию сигнала окисления Ag⁰ проводили на ИГЭ при потенциале 0,03±0,01 В (рис.19). Электродный механизм представлен уравнениями (1,2):



Следовательно, при растворении НЧ серебра в HNO₃ происходит их деградация до свободной ионной формы серебра с последующим формированием Ag⁰ на поверхности ИГЭ во время стадии накопления. После этого, регистрируется аналитический сигнал растворения серебра при +0,3 В.

Другой высокочувствительный способ обнаружения НЧ серебра – КИВ, в котором инверсионная стадия включает накопление осадка или твердой фазы AgCl↓. На рисунке 20 представлены вольтамперограммы восстановления серебра из AgCl↓ на ЗАУСЭ от НЧ серебра в присутствии хлорид ионов в фоновом электролите.

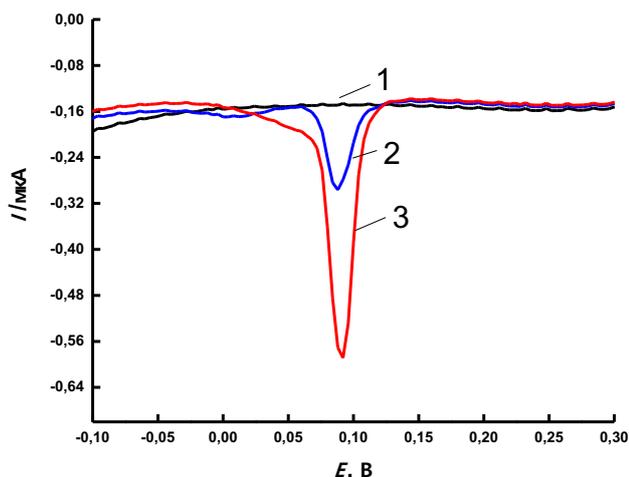
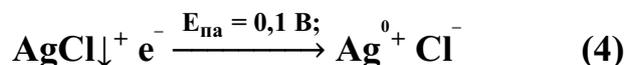
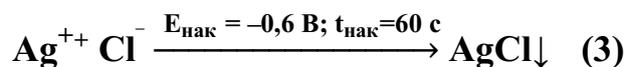


Рисунок 20 – Катодные вольтамперограммы серебра из $\text{AgCl}\downarrow$ на ЗАСУЭ, 1 – фоновый электролит ($0,01 \text{ моль/дм}^3 \text{ KCl} + 0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ HNO}_3$); 2 – НЧ серебра (1 мкмоль/дм^3); 3 – НЧ серебра (10 мкмоль/дм^3), $W=0,1 \text{ В/с}$, $E_{\text{нак}} = -0,6 \text{ В}$, $t_{\text{нак}}=60 \text{ с}$

НЧ серебра предварительно растворяли в 1 моль/дм^3 растворе HNO_3 и вводили в электрохимическую ячейку, в которой концентрация хлорид ионов составила $0,01 \text{ моль/дм}^3$, регистрацию сигнала вели на ЗАУСЭ. Согласно данным рис. 20 в катодной области наблюдался сигнал восстановления серебра из $\text{AgCl}\downarrow$ при потенциале $+0,10 \pm 0,01 \text{ В}$. Электродные механизмы представлены уравнениями (3,4):



Следовательно, при растворении НЧ серебра в HNO_3 происходит их деградация до свободной ионной формы серебра с последующим формированием $\text{AgCl}\downarrow$ на поверхности ЗАУСЭ во время стадии накопления. После этого, регистрируется аналитический сигнал восстановления серебра из $\text{AgCl}\downarrow$ при $+0,1 \text{ В}$.

3.2.4 Регистрация электрохимического отклика от биоконъюгатов методами инверсионной вольтамперометрии

При подобранных рабочих условиях далее были исследованы электрохимические свойства биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$). На основании данных, представленных в разделе 3.2.1, наиболее подходящим материалом электрода в случае электрохимического детектирования серебра НЧ через труднорастворимое соединение ($AgCl\downarrow$) является ЗАУСЭ. На рисунке 21 показаны катодные вольтамперограммы восстановления серебра из $AgCl\downarrow$ от биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$).

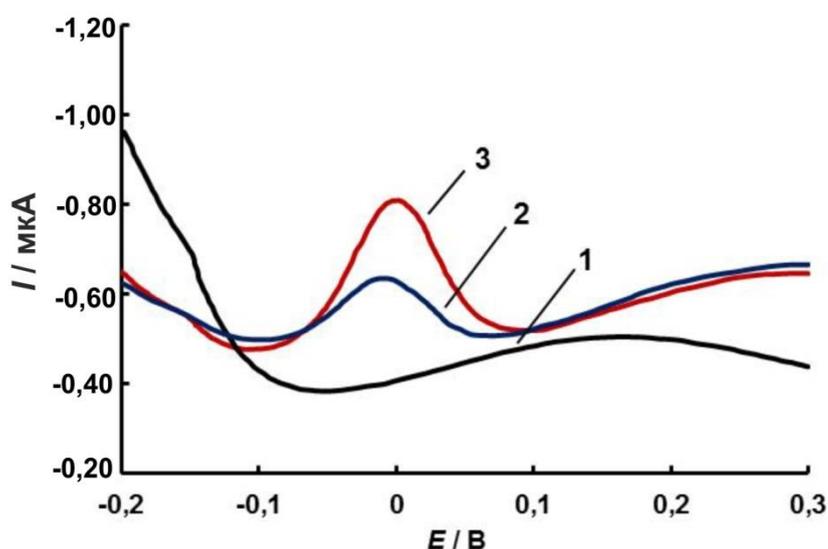


Рисунок 21 – Катодные вольтамперограммы серебра из $AgCl\downarrow$ на ЗАУСЭ от биоконъюгатов; 1 – фоновый электролит ($0,01\text{ моль/дм}^3\text{ KCl} + 0,1\text{ моль/дм}^3\text{ HNO}_3$), 2 – $Abs@AgHЧ$; 3 – $Ab@AgHЧ$; $C_{HЧ} = 10\text{ мкмоль/дм}^3$, $W=0,1\text{ В/с}$; $E_{\text{нак}} = -0,6\text{ В}$; $t_{\text{нак}}=60\text{ с}$

Из результатов, приведенных в разделе 3.2.2, следует, что в случае электрохимического детектирования НЧ серебра через Ag^0 наиболее подходящим материалом электрода является ИГЭ. На рисунке 22 показаны анодные вольтамперограммы серебра биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$) на ИГЭ.

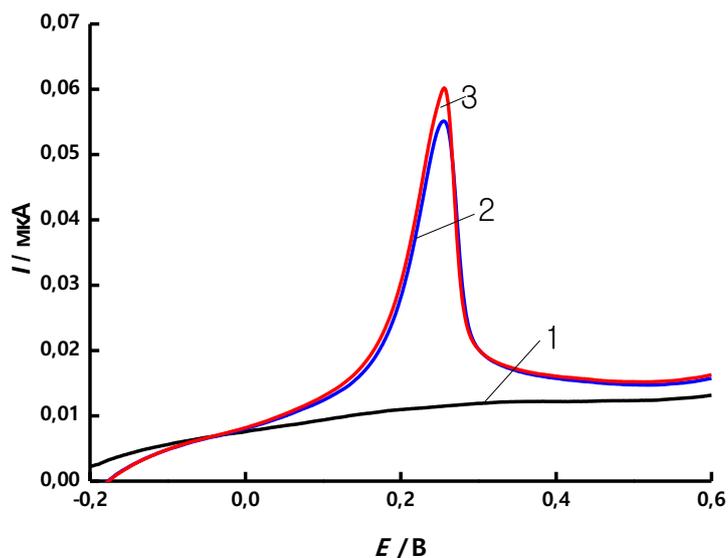


Рисунок 22 – Анодные вольтамперограммы серебра на ИГЭ от биоконъюгатов, 1 – фоновый электролит ($0,5 \text{ моль/дм}^3 \text{ KNO}_3 + 0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ HNO}_3$), 2 – $Ab@AgHЧ$; 3 – $Abs@AgHЧ$; $C_{HЧ} = 10 \text{ мкмоль/дм}^3$, $W=0,1 \text{ В/с}$; $E_{\text{нак}} = -0,6 \text{ В}$; $t_{\text{нак}}=60 \text{ с}$

Полученные электрохимические пики биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ и $Abs@AgHЧ$ на ЗАСУЭ и ИГЭ в подобранных рабочих условиях можно использовать в качестве аналитических сигналов при разработке электрохимических иммуносенсоров, для определения антител к ВКЭ методами инверсионной вольтамперометрии.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВКЭ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕЗИРОВАННЫХ БИОКОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ НЧ СЕРЕБРА

Проведены исследования по возможности использования синтезированных биоконъюгатов ($Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$) на основе НЧ серебра в качестве электрохимических меток для определения антител к ВКЭ с использованием предложенных вариантов сборки электрохимического иммуносенсора (Рис. 9, 10). Принимая во внимание предлагаемый формат непрямого неконкурентного иммуноанализа, где происходит образование иммунного комплекса на поверхности ИГЭ «антиген – антитело — биоконъюгат», то можно ожидать, что ток восстановления/окисления от НЧ серебра даст информацию о наличии и количестве антител к ВКЭ. В качестве контрольных экспериментов использовали опыты с антителами неспецифическими к антигену ВКЭ и холостой опыт без иммобилизованного на поверхности электрода антигена ВКЭ, вся поверхность электрода была заблокирована БСА.

4.1 Процедура иммобилизации антигена ВКЭ

Ключевым элементом иммуносенсора, как правило, является этап иммобилизации биологического материала на подходящей функционализированной поверхности, где происходит взаимодействие антиген – антитело. Эффективная стратегия иммобилизации на сенсорной платформе имеет решающее значение в иммуноанализе, поскольку она непосредственно определяет воспроизводимость, чувствительность и производительность электрохимических иммуносенсоров [110]. Иммобилизация может происходить на разных твердых носителях, в большинстве наших исследований в качестве платформы для иммобилизации биологического материала была использована поверхность импрегнированного графитового электрода.

Методика сборки электрохимического иммуносенсора и варианты обнаружения антител к ВКЭ подробно описана в разделе 2.4.6. Необходимо отметить, что функционализирование поверхности ИГЭ для иммобилизации антигена ВКЭ осуществлялось в несколько стадий: 1) электрохимическое нанесение золота на поверхность электрода; 2) формирование самоорганизующихся монослоёв цистеамина на поверхности золота; 3) применением бифункционального сшивающего реагента, глутарового альдегида, для ковалентного связывания антигена ВКЭ. Эффективность модификации поверхности электрода оценивалась методом ЦВА с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. На рис. 23 представлены ЦВА $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ на разных этапах модификации поверхности электрода.

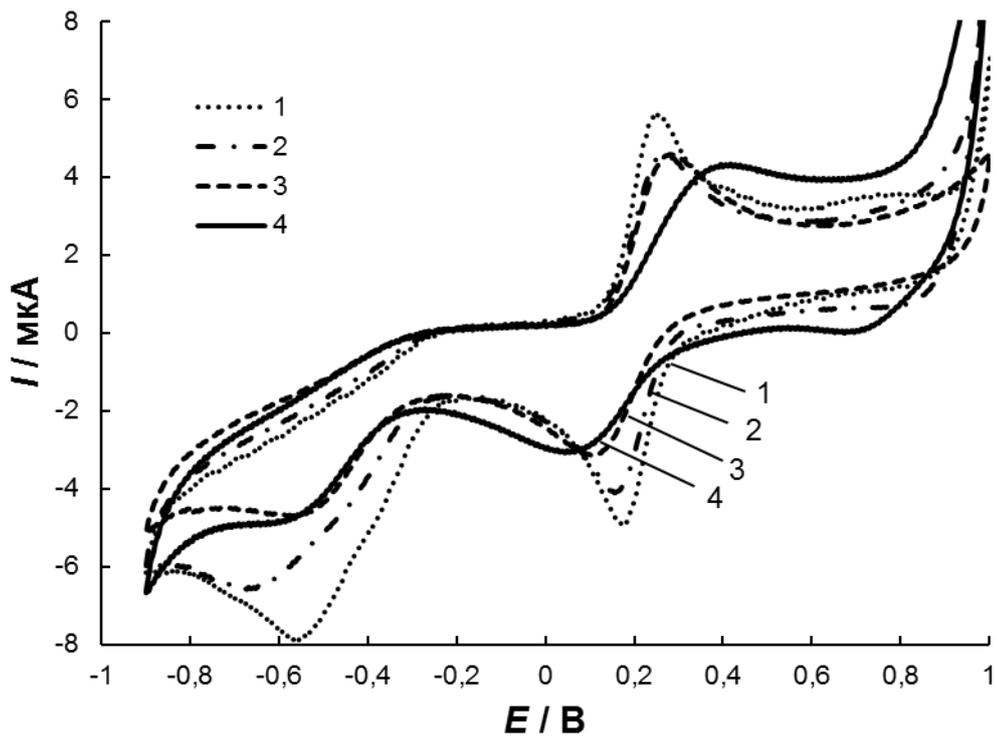


Рисунок 23 – Циклические вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ($c=10$ ммоль/дм³) в фоновом электролите 0,1 моль/дм³ КСl на разных этапах модификации поверхности электрода (1 – золото, 2 – цистеамин, 3 – глутаровый альдегид, 4 – антиген ВКЭ), скорость развертки потенциала 0,05 В/с

Полученные результаты показывают, что поверхность электрода была успешно модифицирована. После каждого этапа модифицирования электрода, увеличивается разность потенциалов между анодным и катодным пиками, что указывает на образование следующего слоя, из-за чего затруднён процесс переноса электрона.

4.2 Исследования электрохимического поведения НЧ серебра конъюгированных с антителами к ВКЭ на разных этапах модификации электрода

В работе было уделено внимание оценки достоверности вольтамперометрического сигнала от НЧ серебра в составе биоконъюгата, на всех этапах разработки электрохимического иммуносенсора для определения ВКЭ. Для проведения данного эксперимента был выбран биоконъюгат состава – *Ab@AgНЧ*. Регистрацию электрохимического сигнала от НЧ серебра на разных этапах модификации электрода осуществляли методами КИВ и АИВ на ЗАУСЭ и ИГЭ соответственно. Рабочие условия проведения электрохимического эксперимента описаны в разделе 3.2.3. В таблице 8 представлены значения токов серебра биоконъюгатов *Ab@AgНЧ* на ЗАУСЭ и ИГЭ после каждого этапа модификации поверхностей электродов и процедуры предполагаемого захвата биоконъюгата. Химическое растворение серебра с поверхности электродов осуществляли путём его погружения в 1 моль/дм³ раствор HNO₃ с последующей регистрацией сигнала.

Таблица 8 – Величины токов серебра от биоконъюгатов *Ab@AgНЧ* на разных этапах модификации ЗАУСЭ и ИГЭ

№	Этап модификации	$I_{\text{пк}}$ серебра на ЗАУСЭ, мкА (n=5)	$I_{\text{па}}$ серебра на ИГЭ, мкА (n=5)
1	Модифицирование поверхности электрода золотом	–	–
2	Тиолирование поверхности в растворе цистеаминa	0,061±0,013	0,085±0,007
3	Сшивание с глутаровым альдегидом	–	–

Из таблицы 8 видно, что после модификации поверхности электрода цистеамином наблюдался ток серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ на ЗАУСЭ и ИГЭ. Это объясняется тем, что молекула цистеамина содержит группу $-NH_2$, которая может связывать НЧ серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ [111]. На следующей стадии модификации в растворе глутарового альдегида никаких сигналов от серебра не наблюдалось, что минимизирует возможность проникновения НЧ серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ в слой цистеамина и позволяет избежать неспецифического связывания биологического слоя с НЧ серебра.

4.3 Применение биоконъюгатов полученных методом физической адсорбции ($Ab@AgHЧ$) для определения антител к ВКЭ

На этом этапе работы для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$) была произведена процедура сборки электрохимического иммуносенсора с последующей регистрацией сигнала от НЧ серебра методами инверсионной вольтамперометрии. В работе произведено сравнение чувствительности определения антител к ВКЭ с использованием $Ab@AgHЧ$ на разных поверхностях электродов (ЗАСУЭ, ИГЭ). Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора представлено в разделе и 2.4.6 (Рис.9,10). Анализируемый раствор представлял собой калибровочные образцы антител к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG" (Новосибирск, Россия) с содержанием антител к ВКЭ от 50 до 1600 Ед/см³. Рабочие условия проведения электрохимических экспериментов описаны в разделах 2.4.4 и 2.4.5. Электрохимический иммуносенсор, на поверхности которого образован комплекс антиген-антитело, предварительно погружали в 1 см³ HNO₃ (1 моль/дм³) для химического растворения НЧ серебра в составе $Ab@AgHЧ$.

На рисунке 24 представлены вольтамперные кривые восстановления серебра из AgCl↓ на ЗАУСЭ в присутствии антигена ВКЭ и антител к ВКЭ в диапазоне концентраций от 50 до 1600 Ед/см³.

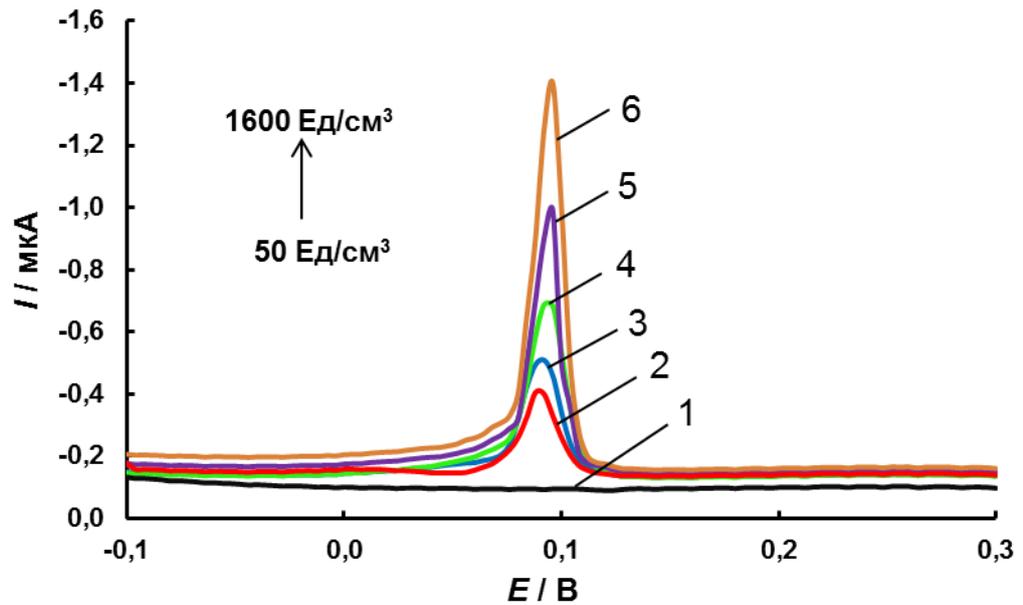


Рисунок 24 – Катодные вольтамперограммы серебра $Ab@AgHЧ$ на ЗАСУЭ (1 – фоновая кривая, холостой опыт без антител к ВКЭ, 2-6 – антиген на поверхности электрохимического иммуносенсора с различной концентрацией антител (50 до 1600 Ед/см³) в фоновом электролите 0,01 моль/дм³ КСl и 0,1 моль/дм³ HNO₃, $W = 0,1$ В/с, $E_{нак} = -0,6$ В, $t_{нак} = 60$ с

Как видно из рисунка 24, наблюдается увеличение значений величин катодных токов серебра $Ab@AgHЧ$ от концентраций антител к ВКЭ при потенциале $0,10 \pm 0,01$ В по сравнению с фоновой кривой. Пики восстановления серебра из $AgCl \downarrow$ хорошо выражены, что позволяет применять $Ab@AgHЧ$ в качестве сигналообразующей метки в дальнейших исследованиях. На основании полученных данных была построена градуировочная зависимость (Рис.25), позволяющая определять антитела к ВКЭ с использованием биоконъюгата состава $Ab@AgHЧ$ в диапазоне концентраций от 50 до 1600 Ед/см³.

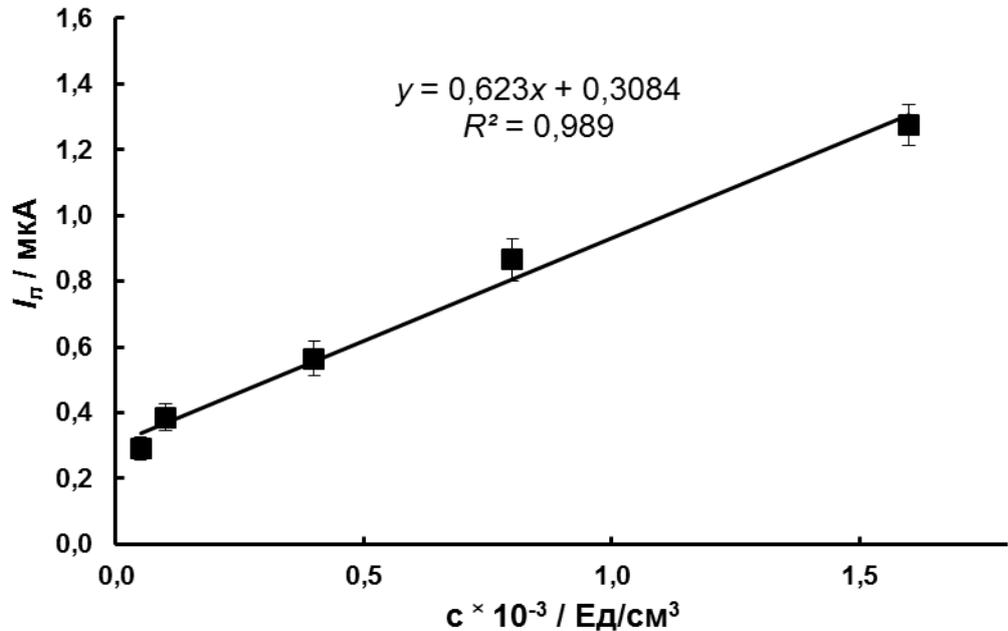


Рисунок 25 – Зависимость тока восстановления серебра биоконъюгатов *Ab@AgНЧ* от концентрации антител к ВКЭ в электрохимической ячейке. $C_{\text{антител}} =$ от 50 до 1600 Ед/см³. Фоновый электролит – 0,01 моль/дм³ КСl и 0,1 моль/дм³ HNO₃, $W = 0,1$ В/с, $E_{\text{нак}} = -0,6$ В, $t_{\text{нак}} = 60$ с

Диапазон определяемых концентраций антител к ВКЭ с использованием *Ab@AgНЧ* сопоставим с сертифицированным коммерческим набором «ВектоВКЭ IgG» (Новосибирск, Россия). Использование биоконъюгата *Ab@AgНЧ* в качестве метки в электрохимическом иммуносенсоре, где определение антител к ВКЭ осуществляется с использованием КИВ на ЗАУСЭ, обеспечивает предел обнаружения 50 Ед/см³.

Аналогично были проведены эксперименты с использованием *Ab@AgНЧ* методом АИВ на ИГЭ. Необходимо отметить, что чувствительность определения антител к ВКЭ данным методом была ниже по сравнению с методом КИВ, так как сигнал окисления серебра биоконъюгатов *Ab@AgНЧ* для исследуемой концентрации антител 100 Ед/см³ не наблюдался.

В таблице 9 представлены результаты сравнительного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Ab@AgHЧ$ методами инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ

Таблица 9 – Параметры градуировочных характеристик определения антител к ВКЭ методами инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ с использованием $Ab@AgHЧ$

Электрод	Аналитический сигнал	Уравнение регрессии	Линейный диапазон концентраций, Ед/см ³	Предел обнаружения, Ед/см ³
ЗАУСЭ	восстановление серебра из $AgCl\downarrow$	$y = 0,623x + 0,3084$ $R^2 = 0,9890$	50 – 1600	50
ИГЭ	окисление Ag^0	$y = 0,330x - 0,048$ $R^2 = 0,9775$	400 – 1600	168

Как видно из таблицы 9, на основании электрохимических измерений по определению антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, метод КИВ с использованием ЗАУСЭ является предпочтительным, ввиду большей чувствительности проведения анализа. Вероятно, это связано с физическими свойствами УСЭ. В случае использования ЗАУСЭ поверхность электрода представляет собой нано/микроэлектродный золотой ансамбль, обладающий высокой чувствительностью регистрации аналитического сигнала серебра в режиме КИВ. Кроме того, в отличие от Ag^0 при накоплении труднорастворимого соединения равновесие от ионного серебра смещено в сторону $AgCl\downarrow$, что количественно увеличивает содержание серебра в осадке на электроде. При построении дальнейших экспериментов с целью апробации разработанного электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ для количественного определения антител к ВКЭ в реальных объектах возможно применение градуировочной зависимости, представленной на рисунке 25.

4.4 Применение биоконъюгатов полученных методом ковалентного взаимодействия ($Abs@AgHЧ$) для определения антител к ВКЭ

На данном этапе работы для изучения возможности применения другого типа биоконъюгатов ($Abs@AgHЧ$) для определения антител к ВКЭ была произведена процедура сборки электрохимического иммуносенсора с последующей регистрацией сигнала от серебра методами инверсионной вольтамперометрии. Этапы исследования были аналогичны разделу 4.3.

На рисунке 26 представлены вольтамперные кривые окисления серебра на ИГЭ в присутствии антигена ВКЭ и антител к ВКЭ в диапазоне концентраций от 100 до 1600 Ед/см³.

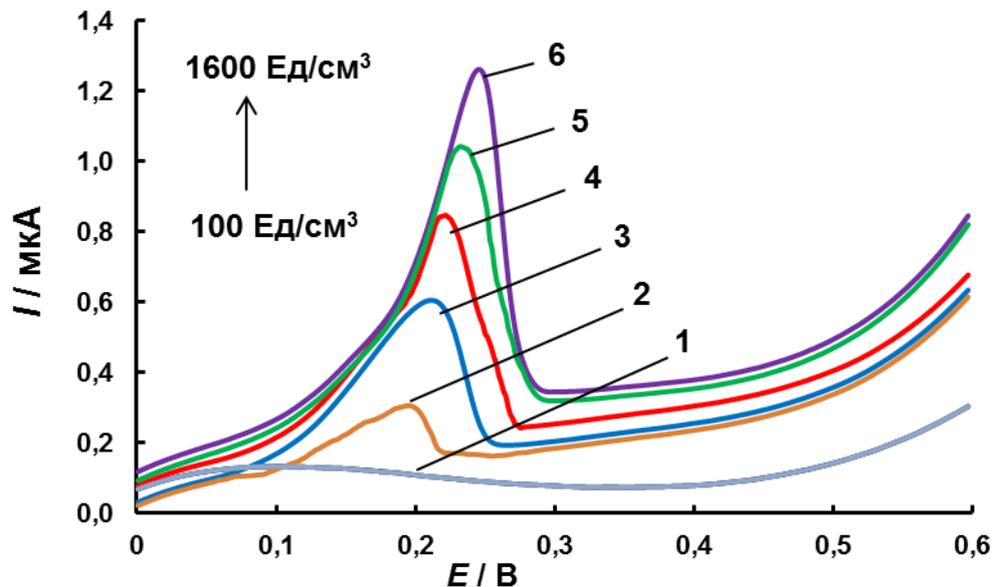


Рисунок 26 – Анодные вольтамперограммы серебра биоконъюгатов $Abs@AgHЧ$ на ИГЭ (1 – фоновая кривая, холостой опыт без антител к ВКЭ, 2-6 – антиген на поверхности электрохимического иммуносенсора с различной концентрацией антител (100 до 1600 Ед/см³) в фоновом электролите 0,5 моль/дм³ KNO_3 и 0,1 моль/дм³ HNO_3 , $W = 0.1$ В/с, $E_{нак} = -0,6$ В, $t_{нак} = 60$ с

Как видно из рисунка 26, наблюдается увеличение значений величин токов окисления серебра от концентраций антител к ВКЭ на ИГЭ при потенциале $0,22 \pm 0,01$ В по сравнению с фоновой кривой. Пики окисления серебра хорошо

выражены, что позволяет применять $Abs@AgHЧ$ в качестве сигналообразующей метки в дальнейших исследованиях. На основании полученных данных была построена градуировочная зависимость (Рис.27), позволяющая определять антитела к ВКЭ с использованием биоконъюгата состава $Abs@AgHЧ$ в диапазоне концентраций от 100 до 1600 Ед/см³.

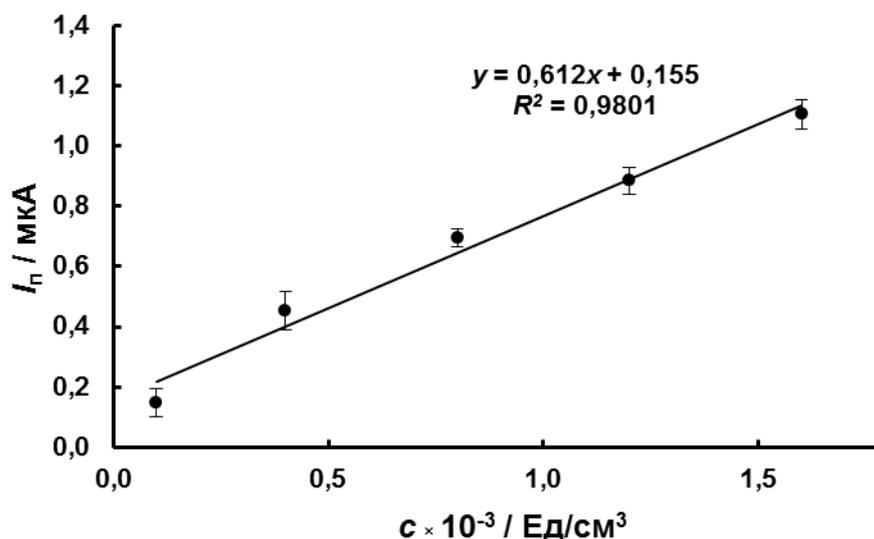


Рисунок 27 – Зависимость тока окисления серебра биоконъюгатов $Abs@AgHЧ$ от концентрации антител к ВКЭ в электрохимической ячейке. $C_{\text{антител}} =$ от 400 до 1600 Ед/см³. Фоновый электролит – 0,5 моль/дм³ KNO_3 и 0,1 моль/дм³ HNO_3 , $W = 0,1$ В/с, $E_{\text{нак}} = -0,6$ В, $t_{\text{нак}} = 60$ с

Диапазон определяемых концентраций антител к ВКЭ с использованием $Abs@AgHЧ$ сопоставим с сертифицированным коммерческим набором «ВектоВКЭ IgG» (Новосибирск, Россия). Аналогично были проведены эксперименты с использованием $Abs@AgHЧ$ методом КИВ на ЗАСУЭ. В таблице 10 представлены результаты сравнительного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Abs@AgHЧ$ методами инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ.

Таблица 10 – Параметры градуировочных характеристик определения антител к ВКЭ методами инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ с использованием биоконъюгата $Abs@AgHЧ$

Электрод	Аналитический сигнал	Уравнение регрессии	Линейный диапазон концентраций, Ед/см ³	Предел обнаружения, Ед/см ³
ЗАУСЭ	восстановление серебра из $AgCl\downarrow$	$y = 0,498x + 0,244$ $R^2 = 0,9771$	200 – 1600	110
ИГЭ	окисление Ag^0	$y = 0,612x + 0,155$ $R^2 = 0,9801$	100 – 1600	90

Анализируя данные, представленные в таблице 10, можно сделать вывод, что в случае использования ИГЭ, где происходит определение антител к ВКЭ путем окисления Ag^0 на поверхности электрода, где был достигнут меньший предел обнаружения, как ожидалось в сравнении с ЗАУСЭ. Поэтому при построении дальнейших экспериментов с целью апробации разработанного электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгата $Abs@AgHЧ$ для количественного определения антител к ВКЭ в реальных объектах возможно применение градуировочной зависимости, представленной на рисунке 27.

Таким образом, в разделах 4.3 и 4.4 полученные биоконъюгаты $Ab@AgHЧ$ и $Abs@AgHЧ$ были успешно применены в разработке электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ. По результатам оценки результатов электрохимических исследований для регистрации сигнала серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ предпочтительнее использовать ЗАУСЭ в режиме катодной инверсионной вольтамперометрии, а для $Abs@AgHЧ$ предпочтительнее использовать ИГЭ в режиме анодной инверсионной вольтамперометрии.

ГЛАВА 5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗРАБОТАННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВКЭ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКОНЬЮГАТОВ $Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$

Высокая чувствительность, селективность, экспрессность характерна для электроаналитических методов анализа. Современной тенденцией является создание вольтамперометрических методик для количественного определения антител к различным возбудителям заболеваний. Такие метрологические характеристики, как предел обнаружения, диапазон определяемых содержаний, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность и точность являются важнейшими характеристиками любой методики количественного анализа.

Поэтому завершающей стадией количественного определения антител к ВКЭ в объектах исследования посредством предложенного в настоящей работе электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$ стала статистическая обработка результатов измерений. При оценке метрологических характеристик набор статистических данных осуществляли экспериментально с использованием калибровочных образцов антител к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG" (Новосибирск, Россия) в качестве объекта анализа.

5.1 Установление предела обнаружения антител к ВКЭ с использованием электрохимического иммуносенсора

Предел обнаружения (C_{min}) – это наименьшее содержание вещества, которое может быть обнаружено по данной методике с заданной степенью достоверности [112]. Для установления предела обнаружения антител к ВКЭ в калибровочных образцах с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$ разработанным электрохимическим иммуносенсором использовали 3σ критерий. Проводили анализ холостой пробы, при этом предел обнаружения принимали

равным утроенному значению стандартного отклонения шумового сигнала с учётом углового коэффициента градуировочного графика. Значение предела обнаружения вычисляли по уравнению:

$$C_{min} = \frac{3S_{фон}}{b}$$

где $S_{фон}$ – стандартное отклонение сигнала фона; b – коэффициент чувствительности, характеризующий отклик аналитического сигнала на содержание компонента.

В таблице 11 указаны полученные значения пределов обнаружения антител к ВКЭ в калибровочных образцах для разработанного электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$.

Таблица 11 – Установление предела обнаружения ($n=5$, $P=0,95$)

Биоконъюгат	Электрод / Аналитический сигнал	Определяемое вещество	$S_{фон}$	b	Предел обнаружения, Ед/см ³
$Ab@AgHЧ$	ЗАУСЭ / восстановление серебра из $AgCl\downarrow$	Антитела к ВКЭ	0,0103	0,623	50
$Abs@AgHЧ$	ИГЭ / окисление Ag^0		0,0184	0,612	90

5.2 Подтверждение линейности градуировочных характеристик разработанного электрохимического иммуносенсора

Полученные пики восстановления и окисления серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ и $Abs@AgHЧ$ могут быть использованы в качестве аналитических сигналов для количественного определения антител к ВКЭ методами инверсионной вольтамперометрии.

Для разработки электрохимического иммуносенсора в качестве аналитического сигнала был использован сигнал восстановления серебра из $AgCl\downarrow$ от биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ при потенциале $0,10\pm 0,01$ В на ЗАУСЭ и сигнал окисления Ag^0 от $Abs@AgHЧ$ при потенциале $0,22\pm 0,01$ В на ИГЭ, где зависимость тока от концентрации антител к ВКЭ носит линейный характер. Линейный диапазон от концентраций антител к ВКЭ сохраняется в интервале от

50 до 1600 Ед/см³ для $Ab@AgHЧ$ и от 100 до 1600 Ед/см³ для $Abs@AgHЧ$. Данные диапазоны концентраций и полученные пределы обнаружения достаточны для определения антител к ВКЭ в реальных объектах исследования. Уравнения регрессии полученных градуировочных характеристик для $Ab@AgHЧ$ и $Abs@AgHЧ$: $y=0,623x+0,3084$ ($R^2=0,989$) $y=0,612x+0,155$ ($R^2=0,9801$), где y – ток восстановления серебра из $AgCl\downarrow$ или окисления Ag^0 соответственно, мкА; x – концентрация антител к ВКЭ, Ед/см³.

Необходимо оценить правильность (адекватность) описания процесса данной модели (в виде уравнения регрессии). Рассмотрим оценку адекватности на примере $Ab@AgHЧ$. Для этого построим таблицу зависимости тока восстановления серебра из $AgCl\downarrow$ от $Ab@AgHЧ$ на ЗАУСЭ от концентрации антител к ВКЭ (Таблица 12).

Таблица 12 – Зависимость высоты тока восстановления серебра из $AgCl\downarrow$ от $Ab@AgHЧ$ на ЗАУСЭ в зависимости от концентрации антител к ВКЭ

№	Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Интенсивность тока восстановления $AgCl\downarrow$ от $Ab@AgHЧ$				
		I_{1i} , мкА	I_{2i} , мкА	I_{3i} , мкА	I_{cp} , мкА	$\Sigma(I_i - I_{cp})^2$
1	50	0,268	0,298	0,306	0,291	0,000803
2	100	0,376	0,442	0,336	0,385	0,00573
3	400	0,575	0,518	0,603	0,565	0,00375
4	800	0,884	0,951	0,787	0,874	0,0136
5	1600	1,295	1,384	1,151	1,277	0,0277
						$\Sigma=0,0515$

Оценим дисперсию воспроизводимости, используя данные параллельных определений каждого независимого опыта по формуле:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\Sigma(I_i - I_{cp})^2}{5(3-1)} = 0,00515$$

Где N – число экспериментальных точек, n – число параллельных определений.

Далее оценим дисперсию адекватности по расчетам, произведенным в таблице 13, где I^* – значения токов, рассчитанные по уравнению регрессии $y=0,623x+0,3084$.

Таблица 13 – Оценка адекватности модели

№	Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	I_{cp} , мкА	I^* , мкА	$(I^* - I_{cp})$, мкА
1	50	0,29067	0,33955	0,04888
2	100	0,38467	0,3707	-0,014
3	400	0,56533	0,5576	-0,0077
4	800	0,874	0,8068	-0,0672
5	1600	1,27667	1,3052	0,02853
				$\Sigma=0,00797$

После этого проводится оценка дисперсии адекватности по формуле:

$$S_{ад}^2 = \frac{n \cdot \Sigma(I^* - I_{cp})^2}{N - k} = \frac{3 \cdot 0,00797}{5 - 1} = 0,00598$$

Где n – число параллельных опытов, N – число экспериментальных точек, k – число независимых переменных.

Далее находим экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{вос}^2} = 1,16$$

Находим табличное значение критерия Фишера для числа степеней свободы $(1-P) = (1 - 0.95) = 0.05$ и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 5 - 1 = 4$$

$$\Rightarrow F_{табл} = 3,48$$

$$f_2 = N(n - 1) = 5(3 - 1) = 10$$

Таким образом, поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше табличного:

$$1,12 < 3,48 \quad (19)$$

полученная модель описывает процесс адекватно.

Рассмотрим оценку адекватности на примере $Abs@AgHЧ$. Для этого построим таблицу зависимости тока восстановления серебра от $Abs@AgHЧ$ на ИГЭ от концентрации антител к ВКЭ (Таблица 14).

Таблица 14 – Зависимость высоты тока восстановления серебра от $Abs@AgHЧ$ на ИГЭ в зависимости от концентрации антител к ВКЭ

№	Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Интенсивность тока окисление Ag^0 от $Abs@AgHЧ$				
		I_{1i} , мкА	I_{2i} , мкА	I_{3i} , мкА	I_{cp} , мкА	$\Sigma(I_i - I_{cp})^2$
1	100	0,187	0,216	0,158	0,187	0,00168
2	400	0,391	0,454	0,418	0,421	0,00199
3	800	0,678	0,727	0,676	0,694	0,00167
4	1200	0,927	0,889	0,835	0,883	0,00427
5	1600	1,134	1,129	1,049	1,104	0,00455
						$\Sigma=0,0142$

Оценим дисперсию воспроизводимости, используя данные параллельных определений каждого независимого опыта по формуле:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\Sigma(I_i - I_{cp})^2}{5(3-1)} = 0,00142$$

Где N – число экспериментальных точек, n – число параллельных определений.

Далее оценим дисперсию адекватности по расчетам, произведенным в таблице 15, где I^* - значения токов, рассчитанные по уравнению регрессии $y=0,612x+0,155$.

Таблица 15 – Оценка адекватности модели

№	Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	I_{cp} , мкА	I^* , мкА	$(I^* - I_{cp})$, мкА
1	100	0,187	0,216	0,0292
2	400	0,421	0,399	-0,0212
3	800	0,694	0,645	-0,0491
4	1200	0,884	0,889	0,00573
5	1600	1,1040	1,1342	0,0302
				$\Sigma=0,00465$

После этого проводится оценка дисперсии адекватности по формуле:

$$S_{ад}^2 = \frac{n \cdot \Sigma(I^* - I_{ср})^2}{N - k} = \frac{3 \cdot 0,00645}{5 - 1} = 0,00349$$

Где n – число параллельных опытов, N – число экспериментальных точек, k – число независимых переменных.

Далее находим экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{вос}^2} = 3,43$$

Находим табличное значение критерия Фишера для числа степеней свободы $(1-P) = (1 - 0.95) = 0.05$ и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 5 - 1 = 4$$

$$\Rightarrow F_{табл} = 2,46$$

$$f_2 = N(n - 1) = 5(3 - 1) = 10$$

Таким образом, поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше табличного:

$$2,46 < 3,48 \quad (19)$$

полученная модель описывает процесс адекватно.

Следовательно, градуировочные зависимости, полученные с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора обладают линейностью в диапазоне концентраций от 50 до 1600 Ед/см³ для *Ab@AgHЧ* и от 100 до 1600 Ед/см³ для *Abs@AgHЧ* и могут быть использованы для количественного определения антител к ВКЭ в препарате иммуноглобулина человека против КЭ и в модельном растворе сыворотки крови человека.

5.3 Оценка правильности и специфичности разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ

С целью оценки правильности разрабатываемого электрохимического иммуносенсора с использованием *Ab@AgHЧ*, *Abs@AgHЧ* был проведен сравнительный анализ калибровочных образцов антител к ВКЭ из набора «ВектоВКЭ-IgG» с концентрацией 100, 400, 1600 Ед/см³ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) методами ИФА и разработанным электрохимическим

методом. Методика проведения ИФА представлена в разделе 2.4.8. В таблице 18 представлены результаты сравнительного анализа.

Таблица 18 – Сравнительные результаты тестирования калибровочных образцов, содержащих антитела к ВКЭ, с помощью различных методов ($n = 10$, $P = 0,95$)

Метод	Биоконъюгат	Концентрация антител, Ед/см ³		C ₂ / C ₁ , %
		Введено (C ₁)	Найдено (C ₂)	
КИВ с использованием ЗАУСЭ	<i>Ab@AgНЧ</i>	100	123 ± 24	123
		400	412 ± 31	103
		1600	1643 ± 44	103
АИВ с использованием ИГЭ	<i>Abs@AgНЧ</i>	100	72 ± 32	72
		400	385 ± 31	96
		1600	1554 ± 46	97
ИФА	Антитела к ВКЭ меченные пероксидазой хрена	100	117 ± 18	117
		400	385 ± 26	96
		1600	1625 ± 35	102

При обработке данных использовалась линейная интерполяция. Из полученных результатов видно, что полученные результаты хорошо согласуются между собой. Электрохимический подход по определению антител к ВКЭ с использованием двух биконъюгатов (*Ab@AgНЧ*, *Abs@AgНЧ*) совпадает с возможностями традиционного ИФА. Представленные результаты исследований демонстрируют возможность применения разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ в лабораторной диагностике.

Также при разработке электрохимического иммуносенсора с использованием $Ab@AgHЧ$ и $Abs@AgHЧ$ были проведены исследования специфичности разрабатываемого метода. Для этого проводили контрольные эксперименты с антителами неспецифическими к антигену ВКЭ: калибровочный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ВКЭ (0 Ед/см³) из набора реагентов «ВектоВКЭ-IgG» (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия); антитела моноклональные мышинные Anti- β -Actin (MFCD00164531, Sigma-Aldrich, США). Анализ проводили по разработанной схеме (раздел 2.4.6): электрод с иммобилизованным антигеном ВКЭ инкубировали в растворах не содержащих антитела к ВКЭ, после этого электроды помещали в растворы $Ab@AgHЧ$ и $Abs@AgHЧ$ и проводили определение методами КИВ и АИВ на ЗАСУЭ и ИГЭ соответственно. Кроме того, проводили холостой опыт без иммобилизованного на поверхности электрода антигена ВКЭ, вся поверхность электрода была заблокирована БСА.

В случае контрольных экспериментов, где электрохимическое определение серебра биоконъюгатов проводили по методу КИВ на ЗАСУЭ, откликов не наблюдалось, поскольку иммунокомплекс на поверхности электрода не сформировался. Однако в случае контрольных экспериментов, где электрохимическое определение серебра биоконъюгатов происходило по методу АИВ на ИГЭ наблюдался электрохимический сигнал от серебра, который не превышал 5% от максимума значения тока окисления серебра в образцах, содержащих минимальную концентрацию антител к ВКЭ (100 Ед/см³). В качестве примера контрольного эксперимента на рисунке 28 показаны вольтамперограммы окисления серебра биоконъюгатов $Abs@AgHЧ$ на ИГЭ в присутствии и отсутствии антигена ВКЭ на поверхности электрода [113].

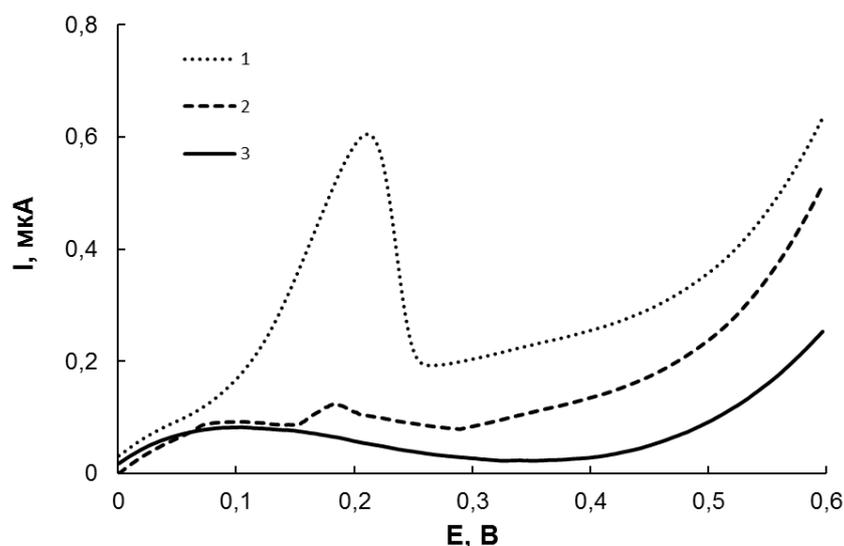


Рисунок 28 – Вольтамперограммы окисления серебра биоконъюгатов *Abs@AgHЧ* на ИГЭ (1 – с антигеном на поверхности электрохимического иммуносенсора, 2 – контрольный эксперимент без антигена, 3 – фоновый электролит – 0,5 моль/дм³ KNO₃ и 0,1 моль/дм³ HNO₃, $W = 0,1$ В/с, $E_{\text{нак}} = -0,6$ В, $t_{\text{нак}} = 60$ с

При построении калибровочных зависимостей для определения антител к ВКЭ с использованием *Abs@AgHЧ* вычитали абсолютное значение тока окисления серебра, полученного в отрицательных контрольных экспериментах, от значения тока окисления серебра полученных в положительных образцах с присутствием антигена на поверхности электрода и образцов содержащих специфические антитела к ВКЭ.

5.4 Подготовка разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ к метрологической аттестации

При подготовке электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ к метрологической аттестации необходимо оценить следующие метрологические характеристики:

1. Показатель повторяемости, представляющий собой СКО результатов, полученных в условиях повторяемости;

2. Показатель внутрилабораторной прецизионности, представляющий собой СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности (разное: время, операторы, приборы);

3. Показатель точности методики, представляющий собой аддитивную сумму характеристик случайной и систематической погрешности.

Алгоритм вычисления показателей качества методики приведен в приложении 1, их расчет – в приложении 2, 3.

Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и *Ab@AgНЧ*, представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и *Ab@AgНЧ* ($P=0,95$, $n=10$)

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности $\pm\Delta_c$		Показатель точности $\pm\Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
100	4,72	4,17	4,98	4,40	17,2	15,2	23,8	21,0
400	5,26	1,27	5,55	1,33	26,3	6,3	30,9	7,4
1600	7,48	0,46	7,89	0,49	40,9	2,5	43,7	2,7

Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и *Abs@AgНЧ* представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и *Abs@AgHЧ*, ($P=0,95$, $n=10$)

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности $\pm\Delta_c$		Показатель точности $\pm\Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
100	4,24	5,44	4,47	5,73	25,8	33,0	31,5	40,4
400	8,35	2,16	8,80	2,28	25,96	6,7	35,1	9,1
1600	10,1	0,64	10,6	0,67	41,1	2,6	46,1	2,9

Рассчитанные показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики в ходе ее реализации в отдельной лаборатории.

Таким образом, найдены диапазоны линейных зависимостей аналитических сигналов серебра биоконъюгатов *Ab@AgHЧ* и *Abs@AgHЧ* от концентрации антител к ВКЭ, проверена линейность градуировочных зависимостей и оценена адекватность модели полученного уравнения регрессии по критерию Фишера. Установлены основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов (показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности).

ГЛАВА 6. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

Для оценки применимости разработанного электрохимического иммуносенсора к анализу реальных объектов были выбраны и проанализированы два объекта: лекарственный препарат иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита (НПО «Вирион», Томск, Россия) и модельный раствор сыворотки крови человека с добавками калибровочных образцов антител к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG". ИФА (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) использовали, как стандартный метод сравнения результатов анализа. Биоконъюгат $Ab@AgHЧ$ использовали для анализа лекарственного препарата иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита (НПО «Вирион», Томск, Россия). Альтернативный биоконъюгат $Abs@AgHЧ$ использовали для анализа модельного раствора сыворотки крови человека. Процедура сборки электрохимического иммуносенсора была аналогичной вышеописанной для калибровочных образцов антител к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG" (Раздел 4.3 и 4.4). Пробоподготовки образцов не производилось. Для каждого эксперимента проводили построение калибровочной кривой с использованием аттестованных контрольных образцов на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащие IgG к ВКЭ, в наборе реагентов «Антитела к вирусу клещевого энцефалита» с концентрациями 100, 400, 1600 Ед/см³ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия).

6.1 Определение концентрации антител в препарате иммуноглобулина человека против КЭ с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора

В качестве первого объекта исследования, содержащего антитела к ВКЭ, был выбран лекарственный препарат иммуноглобулин человеческий против КЭ (НПО «Вирион», Томск, Россия) с концентрацией антител к ВКЭ не менее 80, 160

Ед/см³. Как уже было отмечено выше, электрохимический иммуноанализ производили с использованием биоконъюгата *Ab@AgHЧ*. Принимая во внимание результаты исследований в разделе 4.3, для *Ab@AgHЧ*, был выбран метод КИВ на ЗАУСЭ. ИГЭ выступал в качестве платформы для иммобилизации биологического материала. Таблицы 19, 20 иллюстрируют сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в образцах.

Таблица 19 – Сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в лекарственном препарате с концентрацией антител к ВКЭ не менее 80 Ед/см³, с помощью различных методов ($n=5, P=0,95, F_{кр}=6,39, t_{кр}=2,31$)

Метод	Заявленное содержание антител, Ед/см ³	Концентрация антител, Ед/см ³	<i>F</i> - критерий	<i>t</i> - критерий
	Введено	Найдено		
КИВ с использованием ЗАУСЭ	не менее 80	87 ± 4	1,09	0,43
ИФА	не менее 80	86 ± 4		

Таблица 20 – Сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в лекарственном препарате с концентрацией антител к ВКЭ не менее 160 Ед/см³, с помощью различных методов ($n=5, P=0,95, F_{кр}=6,39, t_{кр}=2,31$)

Метод	Заявленное содержание антител, Ед/см ³	Концентрация антител, Ед/см ³	<i>F</i> - критерий	<i>t</i> - критерий
	Введено	Найдено		
КИВ с использованием ЗАУСЭ	не менее 160	165 ± 4	1,37	2,26
ИФА	не менее 160	172 ± 4		

Результаты электрохимического иммуноанализа согласуются с результатами, полученными с использованием метода ИФА. Приведенные данные подтверждают корректность использования разработанного электрохимического

иммуносенсора с $Ab@AgHЧ$ для определения антител к ВКЭ в препарате иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита. По рассчитанным F - и t -критериям можно утверждать, что различие результатов, полученных методом ИФА и электрохимическим методом статистически незначимо.

6.2 Определение концентрации антител в модельном растворе сыворотки крови человека с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора

Для другого объекта исследования, содержащего антитела к ВКЭ, был выбран альтернативный биоконъюгат $Abs@AgHЧ$. Принимая во внимание результаты исследований в разделе 4.4 для $Abs@AgHЧ$ был выбран метод АИВ на ИГЭ. Необходимо отметить, что иммобилизацию биологического материала осуществляли на другом ИГЭ. Различные концентрации антител к ВКЭ добавляли к образцам сыворотки крови человека предварительно протестированную на отсутствие антител к ВКЭ методом ИФА. Образцы сыворотки крови разводили ФБ содержащим антитела к ВКЭ (800 и 1200 Ед/см³) в соотношении 1 объем сыворотки и 9 объемов буфера (1:10). Таблица 21 иллюстрирует сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови человека, полученными двумя методами.

Таблица 21 – Сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови, с помощью различных методов ($n=5$, $P=0,95$, $F_{кр}=6,39$, $t_{кр}=2,31$)

Метод	Концентрация антител, Ед/см ³		F -критерий	t -критерий
	Введено	Найдено		
АИВ с использованием ИГЭ	800	808 ± 19	1,13	2,65
ИФА	800	840 ± 18		
АИВ с использованием ИГЭ	1200	1223 ± 26	1,24	0,26
ИФА	1200	1219 ± 23		

Результаты электрохимического иммуноанализа согласуются с результатами, полученными с использованием метода ИФА. По рассчитанным F - и t – критериям можно утверждать, что различие результатов, полученных методом ИФА и электрохимическим методом статистически незначимо. Приведенные данные подтверждают корректность использования разработанного электрохимического иммуносенсора с $Abs@AgHЧ$ для определения антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови человека с добавками стандартных растворов антител к ВКЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали возможность применения разработанного электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$) в качестве сигналообразующих меток для определения антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови и лекарственных препаратах, содержащих иммуноглобулины против КЭ. В работе представлены два разработанных подхода для определения антител к ВКЭ в условиях инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ. В качестве метода сравнения применяли наиболее распространенный метод, используемый в РФ для определения антител к ВКЭ в биологических объектах – ИФА.

На основании полученных результатов сформулированы следующие **выводы**:

1) Получены НЧ (средний размер $5,3 \pm 1,2$ нм) и оптимизировано соотношение компонентов при получении биоконъюгатов. С использованием разных стратегий осуществлен процесс биоконъюгирования с НЧ серебра для создания электроактивных биоконъюгатов $Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$ со специфической активностью к антителам к ВКЭ. Морфология НЧ серебра и их биоконъюгатов подтверждена методом ПЭМ;

2) Исследованы электрохимические свойства НЧ серебра и их биоконъюгатов на разных электродах: ИГЭ, ЗАУСЭ методами инверсионной вольтамперометрии;

3) Исследованы электрохимические свойства биоконъюгатов НЧ серебра на разных этапах иммобилизации антигена ВКЭ на поверхности ИГЭ;

4) Разработан алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgНЧ$, $Abs@AgНЧ$) в качестве меток на широкодоступных материалах электродов. Показано, что для регистрации аналитического сигнала серебра биоконъюгатов $Ab@AgНЧ$ методом КИВ, предпочтительнее использовать ЗАУСЭ, где на его поверхности накапливается труднорастворимое соединение $AgCl\downarrow$, а для

регистрации аналитического сигнала серебра биоконъюгатов $Abs@AgНЧ$ предпочтительнее использовать метод АИВ, где происходит окисления Ag^0 на поверхности ИГЭ;

5) Показана специфичность разработанного электрохимического иммуносенсора с контрольными образцами не содержащими антитела к ВКЭ, и рассчитаны основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ;

6) Разработанный иммуносенсор апробирован на реальных объектах (модельных растворах сыворотки крови человека и лекарственных препаратах, содержащих иммуноглобулины против КЭ). Результаты анализа совпадают с результатами, полученными традиционным ИФА методом.

Результаты исследования открывают возможности для дальнейшего развития дешевых, надежных и простых электрохимических иммунодиагностических тест – систем с использованием металлических маркёров, на примере НЧ серебра, как альтернатива ИФА с ферментными метками. Замена ферментной метки на серебрянную позволит увеличить срок хранения диагностикумов и не использовать концевивирующие реактивы.

Использование недорогих вольтамперометрических анализаторов и электродных материалов отечественного производства позволит снизить себестоимость иммунодиагностикумов и решить вопрос с импортозамещением.

Перспективы дальнейших исследований связаны с проведением испытаний по использованию разработанного электрохимического иммуносенсора для совместного определения антител к различным заболеваниям (КЭ, боррелиоз) с использованием разнотипных металлических меток (Ag, Au, Cu). Полученные результаты уже могут стать основой для создания электрохимической тест-системы для определения антител к ВКЭ в полуавтоматическом режиме. Таким образом, разработанный электрохимический иммуносенсор на основе НЧ серебра может быть успешно использован в лабораторно-диагностических и медицинских областях.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ИФА – иммуноферментный анализ

ЭХ – электрохимические

НЧ – наночастицы

БСА – бычий сывороточный альбумин

ЦВА – циклическая вольтамперометрия

ХСЭ – хлорид серебряный электрод

УСЭ – углеродсодержащий электрод

ИГЭ – импрегнированный графитовый электрод

ЗАУСЭ – золото-ансамблевый углеродсодержащий электрод

КЭ – клещевой энцефалит

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

Ab@AgНЧ – биконъюгат на основе НЧ серебра с антителами к ВКЭ

Abs@AgНЧ – биконъюгат на основе НЧ серебра с фрагментами расщеплённых антител к ВКЭ

АИВ – анодная инверсионная вольтамперометрия

КИВ – катодная инверсионная вольтамперометрия

СКО – среднее квадратичное отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoshii, K. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis / K. Yoshii // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2019. – Vol. 81. – №. 3. – P. 343–347.
2. Reusken, C. An evaluation of serological methods to diagnose tick-borne encephalitis from serum and cerebrospinal fluid / C. Reusken, M. Boonstra, S. Rugebregt, S. Scherbeijn, F. Chandler, T. Avšič-Županc, O. Vapalahti, M. Koopmans, C. H. GeurtsvanKessel // *J. Clin. Virol.* – 2019. – Vol. 120. – P. 78–83.
3. Козицина, А. Н. Электрохимический иммуносенсор для диагностики клещевого энцефалита: дис. ... к-та. хим. наук. : 02.00.02 / Козицина Алиса Николаевна. – Екатеринбург, 2003. – 128 с.
4. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA / S. Aydin // *Peptides*. Elsevier Inc. – 2015. – Vol. 72. – P. 4–15.
5. Ramírez, N.B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: Problems and perspectives / N.B. Ramírez, A.M. Salgado, B. Valdman // *Brazilian J. Chem. Eng.* – 2009. – Vol. 26. – №. 2. – P. 227–249.
6. Holford, T.R.J. Recent trends in antibody based sensors / T.R.J. Holford, F. Davis, S.P.J. Higson // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – Vol. 34. – №. 1. – P. 12–24.
7. Gabor, D. Fundamentals and applications of holography / D. Gabor // *Vacuum*. – 1966. – Vol. 16. – №. 6. – P. 313.
8. Wellinghausen, N. Immunological Methods for the Detection of Infectious Diseases / N. Wellinghausen, M. Abele-Horn, O. Donoso Mantke, M. Enders, V. Fingerle, B. Gärtner, J. Hagedorn, H.F. Rabenau, I. Reiter-Owona, K. Tintelnot, M. Weig, H. Zeichhardt, K.-P. Hunfeld Zeichhardt K.-P.H. – Germany : Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle: Oberhaching, 2017. – P. 258.
9. Boguszewska, K. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection / K. Boguszewska, M. Szewczuk, S. Urbaniak, B.T. Karwowski // *Cell. Mol.*

Life Sci. – 2019. – Vol. 76. – №. 23. – P. 4689–4704.

10. Lequin, R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / R.M. Lequin // Clin. Chem. – 2005. – Vol. 51. – №. 12. – P. 2415–2418.

11. Findlay, J.W.A. et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective / J.W.A. Findlay, W.C. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. DeSilva, M.N. Khan, R.R. Bowsher // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – Vol. 21. – №. 6. – P. 1249–1273.

12. Zhang, X. Immunosensors for Biomarker Detection in Autoimmune Diseases / X.Zhang, A. Zambrano, Z.-T. Lin, Y. Xing, J. Rippey, T. Wu // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2017. Vol. 65. – №. 2. – P. 111–121.

13. Pei X. et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review // Anal. Chim. Acta. Elsevier B.V., 2013. Vol. 758. P. 1–18.

14. Justino, C.I.L. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications / C.I.L. Justino, T.A. Rocha-Santos, A.C. Duarte // TrAC - Trends Anal. Chem. – 2010. – Vol. 29. – №. 10. – P. 1172–1183.

15. Justino, C.I.L. Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics / C.I.L. Justino, A.C. Duarte, T.A.P. Rocha-Santos // Advances in Clinical Chemistry. – 2016. – Vol. 73. – P. 65-108 .

16. Ramsden, J. J. Optical Biosensors / J. J. Ramsden // Opt. Biosens. – 2008. – Vol. 10. – P. 109–120.

17. Aranda, P.R. Nanomaterials in fluorescent laser-based immunosensors: Review and applications / P. R. Aranda, G.A. Messina, F.A. Bertolino, S.V. Pereira, M.A. F. Baldo, J. Raba // Microchem. J. – 2018. – Vol. 141. – P. 308–323.

18. Ko, H. Fluorescence immunoassay of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) autoantibodies by using parylene-H film / H. Ko, G. Lee, B.-J. Jeon, J.-C. Pyun // Biochip J. – 2011. – Vol. 5. – №. 3. – P. 242–245.

19. Cao, C. Signal enhancement of surface plasmon resonance immunoassay using enzyme precipitation-functionalized gold nanoparticles: A femto molar level

measurement of anti-glutamic acid decarboxylase antibody / C. Cao, S.J. Sim // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – Vol. 22. – P. 1874–1880.

20. Lee, J.W. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody / J. W. Lee, S. J. Sima, S. M. Choa, J. Lee // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 20. – №. 7. – P. 1422–1427.

21. Aoyagi, S. Development of fluorescence change-based, reagent-less optic immunosensor / S. Aoyagi, M. Kudo // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 20. – №. 8 – P. 1680–1684.

22. Schofield, D.J. Determination of affinities of a panel of IgGs and Fabs for whole enveloped (influenza A) virions using surface plasmon resonance / D.J. Schofield, N.J. Dimmock // *J. Virol. Methods.* – 1996. – Vol. 62. – №. 1. – P. 33–42.

23. Ghorbani, F. Biosensors and nanobiosensors for rapid detection of autoimmune diseases: a review / F.Ghorbani, H. Abbaszadeh, A. Mehdizadeh, M. Ebrahimi-Warkiani, M.-R. Rashidi, M. Yousefi // *Microchim. Acta. Microchimica Acta,* – 2019. – Vol. 186. – №. 12. – P. 838.

24. Pang ,W. Piezoelectric microelectromechanical resonant sensors for chemical and biological detection / W. Pang, H. Zhao, E. S. Kim, H. Zhang, H. Yuc, X. Hu // *Lab Chip.* – 2012. – Vol. 12. –№. 1. – P. 29–44.

25. Skládal, P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions / P. Skládal // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 14. – №. 4. – P. 491–502.

26. Zhou, J. Ultratrace detection of C-reactive protein by a piezoelectric immunosensor based on Fe₃O₄@SiO₂ magnetic capture nanoprobe and HRP-antibody co-immobilized nano gold as signal tags / J. Zhou, N. Gan, T. Li H. Zhou, X. Lia, Y. Cao, L. Wang, W. Sang, F. Hu // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2013. – 178. – P. 494–500.

27. Ghosh, S.K. Anharmonic surface interactions for biomolecular screening and characterization/ Ghosh S.K., V.P. Ostanin, A.A. Seshia // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83. – №. 2. – P. 549–554.

28. Simoska, O. Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time / O. Simoska, K.J. Stevenson // *Analyst*. Royal Society of Chemistry, – 2019. – Vol. 144. – №. 22. – P. 6461–6478.
29. Felix, F.S. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications / F.S. Felix, L. Angnes // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – Vol. 102. – P. 470–478.
30. Pan, M. Nanomaterials for electrochemical immunosensing / M. Pan, Y. Gu, Y. Yun, M. Li, X. Jin, S. Wang // *Sensors*. – 2017. – Vol. 17. – № 5. – P. 1041.
31. Online, V.A. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal / V.A. Online, S.A. Lim // *RSC Adv.* – 2016. – Vol. 6. – P. 24995-25014.
32. Farka, Z. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges / Z. Farka, T. Jurík, D. Kovar, L. Trnkova, P. Skladal // *Chem. Rev.* – 2017. – Vol. 117. – №. 15. – P. 9973–10042.
33. Beitollahi, H. Application of antibody–nanogold–ionic liquid–carbon paste electrode for sensitive electrochemical immunoassay of thyroid-stimulating hormone / H. Beitollahi, S.G. Ivvari, M. T. Mahani // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – Vol. 110. – P. 97–102.
34. Goud, K.Y. Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins: A review / K. Y. Gouda, S. K. Kailasac, V. Kumard, Y. F. Tsang, S.E. Lee, K. V. Gobib, K.-H. Kim // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – Vol. 121, – P. 205–222.
35. Arruebo, M. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications / M. Arruebo, M. Valladares, Á. González-Fernández // *J. Nanomater.* – 2009. – Vol. 2009. – № 15.
36. Montenegro, J.M. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery / J.-M. Montenegro, V. Grazu, A. Sukhanova, S. Agarwal, J.M. Fuente, I. Nabiev, A. Greiner, W. J. Parak // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – Vol. 65. – №. 5. – P. 677–688.
37. Pettinello, R. The immunoglobulins of cold-blooded vertebrates / R.

Pettinello, H. Dooley // *Biomolecules*. – 2014. – Vol. 4. – №. 4. – P. 1045–1069.

38. Marco, A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments / A. Marco // *Microbial Cell Factories*. – 2011. – Vol. 10. – P. 44.

39. Poschenrieder, A. Recent advances in immunodiagnosics based on biosensor technologies—from central laboratory to the point of care / A. Poschenrieder, M. Thaler, R. Junker, P. B. Luppá // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2019. – Vol. 411. – №. 29. – P. 7607–7621.

40. Lu, B. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors / B. Lu, M.R. Smyth, R. O’Kennedy // *Analyst*. – 1996. – Vol. 121. – №. 3. – P. 29R–32R.

41. Choi, Y. Predicting antibody complementarity determining region structures without classification / Y. Choi, C.M. Deane // *Mol. Biosyst.* – 2011. – Vol. 7. – №. 12. – P. 3327–34.

42. Jarocka, U. An electrochemical immunosensor based on a 4,4'-thiobisbenzenethiol self-assembled monolayer for the detection of hemagglutinin from avian influenza virus H5N1. /U. Jarocka, R. Sawicka , A. Góra-Sochacka, A.Sirko, W.Dehaen, J. Radecki, H. Radecka // *Sensors Actuators B Chem.* – 2016. – Vol. 228. – P. 25–30.

43. LaGraff, J.R. Scanning force microscopy and fluorescence microscopy of microcontact printed antibodies and antibody fragments / J.R. LaGraff, Q. Chu-LaGraff // *Langmuir*. – 2006. – Vol. 22. – №. 10. – P. 4685–4693.

44. Hamers-Casterman, C. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. Bajyana Songa, N. Bendahman, R. Hamers // *Nature*. – 1993. – Vol. 363. – №. 6428. – P. 446–448.

45. Vikholm, I. Self-assembly of antibody fragments and polymers onto gold for immunosensing / I. Vikholm // *Sensors and Actuators, B: Chem.* – 2005. – Vol. 106. – №. 1 – P. 311–316.

46. Dai, Z. Novel amperometric immunosensor for rapid separation-free immunoassay of carcinoembryonic antigen / Z. Daia, F. Yanb, H. Yua, X. Hub, H. Ju //

J. Immunol. Methods. – 2004. – Vol. 287. – P. 13–20.

47. Lin, J. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers / J. Lin, H. Ju // Biosensors and Bioelectronics. – 2005. – Vol. 20 – P. 1461–1470.

48. Sarkar, P. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). / P. Sarkar, P. S. Pal, D. Ghosh, S. J. Setford, I. E. Tothill // Int. J. Pharm. – 2002. – Vol. 238. – P. 1–9.

49. Wu, H. Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1 α / H. Wu, G. Liu, J. Wang, Y. Lin // Electrochem. commun. – 2007. – Vol. 9. – №. 7. – P. 1573–1577.

50. Peng, J. Synthesis of Silver Nanoparticle-Hollow Titanium Phosphate Sphere Hybrid as a Label for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Human Interleukin-6 / J. Peng, L. N. Feng, Z. J. Ren, L. P. Jiang, J. J. Zhu // Small. – 2011. – Vol. 7. – №. 20. – P. 2921–2928.

51. Chen, J. Ultrasensitive electrochemical immunoassay based on counting single magnetic nanobead by a combination of nanobead amplification and enzyme amplification / J. Chen, G. Zou, X. Zhang, W. Jin // Electrochem. commun. – 2009. – Vol. 11. – №. 7. – P. 1457–1459.

52. Wilson, M. S. Multiplex Measurement of Seven Tumor Markers Using an Electrochemical Protein Chip / M. S. Wilson, W. Nie // Anal. Chem. – 2006. – Vol. 78. – P. 6476–83.

53. Yuan, Y. An electrochemical enzyme bioaffinity electrode based on biotin-streptavidin conjunction and bienzyme substrate recycling for amplification / Y. Yuan, R. Yuan, Y. Chai, Y. Zhuo, L. Bai, Y. Liao // Anal. Biochem. – 2010. – Vol. 405.– №. 1. – P. 121–126.

54. Lai, G. Dual signal amplification of glucose oxidase-functionalized nanocomposites as a trace label for ultrasensitive simultaneous multiplexed electrochemical detection of tumor markers / G. Lai, F. Yan, H. Ju // Anal. Chem. – 2009. – Vol. 81. – №. 23. – P. 9730–9736.

55. Preechaworapun, A. Development of amperometric immunosensor using

boron-doped diamond with poly(*o*-aminobenzoic acid) / A. Preechaworapun, T. A. Ivandini, A. Suzuki, A. Fujishima, O. Chailapakul, Y. Einaga // *Anal. Chem.* –2008. – Vol. 80. – №. 6. – P. 2077–2083.

56. Wang, Y. Esterase 2-oligodeoxynucleotide conjugates as sensitive reporter for electrochemical detection of nucleic acid hybridization / Y. Wang, M. Stanzel, W. Gumbrecht, M. Humenika, M. Sprinzl // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – Vol. 22. – №. 8. – P. 1798–1806.

57. Yang, H. Signal amplification in immunoassays by using noble metal nanoparticles: a review / H. Yang, W. Xu, Y. Zhou // *Microchimica Acta.* –2019. – Vol. 186. – №. 12. – P. 1–22.

58. Tauran, Y. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles / Y. Tauran, A. Brioude, A. W. Coleman, M. Rhimi, B. Kim // *World J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 4. – №. 3. – P. 35–63.

59. Xiao, T. Au and Au-Based nanomaterials: Synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications / T. Xiao, J. Huanga, D. Wanga, T. Menga, X. Yanga // *Talanta.* – 2020. – Vol. 206. – P. 120210.

60. Lim, L.S. Novel Silver Nanoparticles-based Sensing Probe for the Detection of Japanese Encephalitis Virus Antigen / L. S. Lim, S. F. Chin, S. C. Pang, M. S. H. Sum, D. Perera // *Sains Malaysiana.* – 2017. –Vol. 46. – №. 12. – P. 2447–2454.

61. Xia, N. Electrochemical glycoprotein aptasensors based on the in-situ aggregation of silver nanoparticles induced by 4-mercaptophenylboronic acid / N. Xia, C. Cheng, L. Liu, P. Peng, C. Liu, J. Chen // *Microchimica Acta.* – 2017. – Vol. 184. – P. 4393–4400.

62. Shamsipur, M. A sandwich-type electrochemical immunosensor based on in situ silver deposition for determination of serum level of HER2 in breast cancer patients / M. Shamsipur, M. Emami, L. Farzin, R. Saber // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – Vol. 103. – P. 54–61.

63. Roushani, M. A novel ultrasensitive aptasensor based on silver nanoparticles measured via enhanced voltammetric response of electrochemical

reduction of riboflavin as redox probe for cocaine detection / M. Roushani, F. Shahdost-Fard // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2015. – Vol. 207. – №. PartA. – P. 764–771.

64. Yang, G. Ultrasensitive electrochemical immunosensor of carcinoembryonic antigen based on gold-label silver-stain signal amplification / G. Yang, Y. Lai, Z. Xiao, C. Tang, Y. Deng // *Chinese Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 29. – №. 12. – P. 1857–1860.

65. Lim, S. A. A highly sensitive gold nanoparticle bioprobe based electrochemical immunosensor using screen printed graphene biochip / S. A. Lim, H. Yoshikawa, E. Tamiya, H. M. Yasin, M. U. Ahmed // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry.* – 2014. – Vol. 4. – №. 102. – P. 58460–66.

66. Khristunova, Ye. Preparation and Investigation of Silver Nanoparticle – Antibody Bioconjugates for / Y. Khristunova, E. Korotkova, B. Kratochvil, J. Barek, E. Dorozhko, V. Vyskocil, E. Plotnikov, O. Voronova, V. Sidelnikov // *Sensors.* – 2019. – Vol. 19. – P. 2103–2113.

67. Sanvicens, N. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria / N. Sanvicens, C. Pastells, N. Pascual, M.-P. Marco // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* – 2009. – Vol. 28. – №. 11. – P. 1243–1252.

68. Ting, B. P. The solid-state Ag/AgCl process as a highly sensitive detection mechanism for an electrochemical immunosensor / B.P. Ting, J. Zhang, M. Khan, Y. Y. Yang, J. Y. Jing // *Chem. Commun.* – 2009. – №. 41. P. 6231–6233.

69. Wang, S. Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates / S. Wang, N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen, J. Studer // *Nano Lett.* – 2002. – Vol. 2. – №. 8. – P. 817–822.

70. Li, Z. Current conjugation methods for immunosensors / Z. Li, G. Y. Chen // *Nanomaterials.* – 2018. – Vol. 8. – №. 5. – P. 1–11.

71. Sidorov, I. A. Non-covalent conjugation of nanoparticles to antibodies via electrostatic interactions - A computational model / I. A. Sidorov, P. Prabakaran, D.S. Dimitrov // *J. Comput. Theor. Nanosci.* – 2007. – Vol. 4. – №. 6. – P. 1103–1107.

72. Tanaka, R. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles / R. Tanaka, T. Yuhi, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman,

Y. Takamura, E. Tamiya // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol. 385. – №. 8. – P. 1414–1420.

73. Sokolov, K. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles / K. Sokolov, M. Follen, J. Aaron, I. Pavlova, A. Malpica, R. Lotan, R. Richards-Kortum // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – №. 9. – P. 1999–2004.

74. Szymanski M.S. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays / M.S. Szymanski, R.A. Porter // *J. Immunol. Methods.* – 2013. – Vol. 387. – №. 1–2. – P. 262–269.

75. Wan, Y. Highly Specific Electrochemical Analysis of Cancer Cells using Multi-Nanoparticle Labeling / Y. Wan, Y.-G. Zhou, M. Poudineh, T. S. Safaei, R. M. Mohamadi, E. H. Sargent, S. O. Kelley // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2014. – Vol. 53. – №. 48. – P. 13145–13149.

76. Walkey, C.D. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake / C.D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W. C. W. Chan // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134. – №. 4. – P. 2139–2147.

77. Verma, A. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions / A. Verma, F. Stellacci // *Small.* – 2010. – Vol. 6. – №.1. – P. 12–21.

78. Mitragotri, S. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies / S. Mitragotri, P.A. Burke, R. Langer // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2014. – Vol. 13. – №. 9. – P. 655–672.

79. Arruebo, M. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications / M. Arruebo, M. Valladares, A. González-Fernández // *J. Nanomater.* – 2009. – Vol. 2009. – P. 439389–413.

80. Tsumoto, K. Recent advances in antibody engineering / K. Tsumoto, Y. Hagihara, D. Saerens // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* – 2014. – Vol. 1844. – №. 11. – P. 1889–1890.

81. Vught, R. V. Site-specific functionalization of proteins and their applications to therapeutic antibodies / R. V. Vught, R. J. Pieters, E. Breukink //

Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2014. – Vol. 9. – №. 14. – P. e201402001.

82. Mazzucchelli, S. Dependence of nanoparticle-cell recognition efficiency on the surface orientation of scFv targeting ligands / S. Mazzucchelli, S. Sommaruga, M. O'Donnell, P. Galeffi, P. Tortora, D. Prosperi, M. Colombo // *Biomater. Sci.* – 2013. – Vol. 1. – №. 7. – P. 728–735.

83. Khristunova, E. Electrochemical immunoassay for the detection of antibodies to tick-borne encephalitis virus by using various types of bioconjugates based on silver nanoparticles / E. Khristunova, E. Korotkova, B. Kratochvil, J. Barek, E. Dorozhko, V. Vyskocil // *Bioelectrochemistry.* – 2020. – Vol. 135. – P. 107576–584.

84. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, second ed. / G.T. Hermanson – Academic Press: Oxford, 2008. – P. 1223.

85. Taba, P. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis / P. Taba, E. Schmutzhard, P. Forsberg, I. Lutsar, U. Ljøstad, A. Mygland, I. Levchenko, F. Strle, I. Steiner // *Eur. J Neurol.* – 2017. – Vol. 24. – №. 10. – P. e61-1214.

86. Brainina, K. Electrochemical immunosensor for Forest-Spring encephalitis based on protein a labeled with colloidal gold / K. Brainina, A. Kozitsina, J. Beikin // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – Vol. 376. – №. 4. – P. 481–485.

87. Brainina, K. Z. Electrochemical immunosensor for diagnosis of the forest-spring encephalitis / K. Z. Brainina, A. N. Kozitsina, M. Y. Rubtsova, B. M. Sergeev, S. Y. Saraeva // *Comprehen. Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 49. – №. 06. – P. 265–269.

88. Eng, X. G. Sensitive Impedimetric Immunoassay of Japanese Encephalitis Virus Based on Enzyme Biocatalyzed Precipitation on a Gold Nanoparticle-modified Screen-printed Carbon Electrode / X. G. Eng, F. Zhang, Q. Gao, Y. Lei // *Anal. Sci.* – 2016. – Vol. 32. – P. 1105–1109.

89. Yuan, R. A label-free amperometric immunosensor based on multi-layer assembly of polymerized o-phenylenediamine and gold nanoparticles for determination of Japanese B encephalitis vaccine / R. Yuan, L. Zhang, Q. Li, Y. Chai, S. Cao // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 531. – №. 1. – P. 1–5.

90. Zhang, L. Layer-by-layer self-assembly of films of nano-Au and $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ for the determination of Japanese B encephalitis vaccine / L. Zhang, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, N. Wang, Q. Zhu // *Biochem. Eng. J.* – 2006. – Vol. 28. – № 3. – P. 231–236.
91. Tuan, C. V. Polyaniline Nanowires-Based Electrochemical Immunosensor for Label Free Detection of Japanese Encephalitis Virus / C. V. Tuan, T. Q. Huy, N. V. Hieu, M. A. Tuan, T. Trung // *Anal. Lett.* – 2013. – Vol. 46. – №. 8. – P. 1229–1240.
92. Hien, H.T. Enhancement of biosensing performance using a polyaniline/multiwalled carbon nanotubes nanocomposite / H.T. Hien, H. T. Giang, T. Trung, C. V. Tuan // *J. Mater. Sci.* – 2017. – Vol. 52. – №. 3. – P. 1694–1703.
93. Lai, H.C. Carbon Nanoparticles Based Electrochemical Biosensor Strip for Detection of Japanese Encephalitis Virus / H.C. Lai, S. F. Chin, S. C. Pang, M. S. H. Sum, D. Perera // *J. Nanomater.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–7.
94. Chin, S.F. Carbon nanoparticle modified screen printed carbon electrode as a disposable electrochemical immunosensor strip for the detection of Japanese encephalitis virus / S.F. Chin, L. S. Lim, S. C. Pang, M. S. H. Sum, D. Perera // *Microchim. Acta.* – 2017. – Vol. 184. – P. 491–497.
95. Huy, T.Q. A novel biosensor based on serum antibody immobilization for rapid detection of viral antigens / T.Q. Huy, N. T. H. Hanh, N. T. Thuy, P. V. Chung, P. T. Nga, M. A. Tuan // *Talanta.* – 2011. – Vol. 86. – №. 1. – P. 271–277.
96. Cui, J. Electrochemical voltammetric behaviors of synthetic dengue virus RNAs at ITO sensing electrode / J. Cui, L. Gao, S. Chen, Z. Huang, X. Wang // *J. Electroanal. Chem.* – 2019. – Vol. 851. – P. 113463–468.
97. Santos, C. D. C. A new tool for dengue virus diagnosis: Optimization and detection of anti-NS1 antibodies in serum samples by impedimetric transducers / C. D. C. Santos, P. C. M. Santos, K. L. S. Rocha, R. L. Thomasini, D. B. D. Oliveira, D. L. Franco, L. F. Ferreira // *Microchem. J. Elsevier Inc.* – 2020. – Vol. 154. – P. 104544–554.
98. Cabral-Miranda, G. Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals / G. Cabral-Miranda, A. R. Cardoso, L. C. S.

Ferreira, M. G. Sales, M. F. Bachmann // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – Vol. 113. – P. 101–107.

99. Afsahi, S. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection / S. Afsahi, M. B. Lerner, J. M. Goldstein, J. Lee, X. Tang, D. A. Bagarozzi, D. Pan, L. Locascio, A. Walker, F. Barron, B. R. Goldsmith // *Biosens.* – 2018. – Vol. 100. – P. 85–88.

100. Noskova, G.N. Fabrication and application of gold microelectrode ensemble based on carbon black-polyethylene composite electrode / G.N. Noskova, E. A. Zakharova, V. I Chernov, A. V. Zaichko, E. E. Elesova, A. S. Kabakaev // *Anal. Methods.* – 2011. – Vol. 3. – №. 5. – P. 1130–1135.

101. Solomon, S. D. Synthesis and study of silver nanoparticles / S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz // *J. Chem. Educ.* – 2007. – Vol. 84. – №. 2. – P. 322–325.

102. Li, B. Framework selection can influence pharmacokinetics of a humanized therapeutic antibody through differences in molecule charge / B. Li, D. Tesar, C. A. Boswell, H. S. Cahaya, A. Wong, J. Zhang, Y. G. Meng, C. Eigenbrot, H. Pantua, J. Diao, S. B. Kapadia, R. Deng, R. F. Kelley // *MAbs.* – 2014. – Vol. 6. – №. 5. – P. 1255–1264.

103. You, C.C. The biomacromolecule-nanoparticle interface / C.C. You, A. Chompoosor, V.M. Rotello // *Nano Today.* – 2007. – Vol. 2. – №. 3. – P. 34–43.

104. Hoare, J.P. A Cyclic Voltammetric Study of the Gold-Oxygen System / J.P. Hoare // *J. Electrochem. Soc.* – 1984. – Vol. 131. – №. 8. – P. 1808.

105. Toh, H.S. Chemical interactions between silver nanoparticles and thiols: A comparison of mercaptohexanol against cysteine / H.S. Toh, C. Batchelor-Mcauley, K. Tschulik, R. G. Compton // *Sci. China Chem.* – 2014. – Vol. 57. – №. 9. – P. 1199–1210.

106. Aderibigbe, B. A. Metal-Based Nanoparticles for the Treatment of Infectious Diseases / B. A. Aderibigbe // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22. – P. 1370.

107. Kausaite-Minkstimiene, A. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor / A.

Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, J. Kirlyte, A. Ramanavicius // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82. – №. 15. – P. 6401–6408.

108. Chu, X. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label / X. Chu, X. Fu, K. Chen, G.-L. Shen, R.-Q. Yu // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 20. – №. 9. – P. 1805–1812.

109. Garg, S. Oxidative Dissolution of Silver Nanoparticles by Chlorine: Implications to Silver Nanoparticle Fate and Toxicity / S. Garg, H. Rong, C. J. Miller, T. D. Waite // *Environ. Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 50. – P. 3890–3896.

110. Arkan, E. A novel antibody–antigen based impedimetric immunosensor for low level detection of HER2 in serum samples of breast cancer patients via modification of a gold nanoparticles decorated multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode / E. Arkan, R. Saber, Z. Karimi, M. Shamsipur // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – Vol. 874. – P. 66–74.

111. Agnihotri, S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficiency: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver / S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji // *Nanoscale.* – 2013. – Vol. 5. – P. 7328–7340.

112. Гармаш, А. В. Метрологические основы аналитической химии / А. В. Гармаш, Н. М. Сорокина. – М. : МГУ им. М.В. Ломоносова, 2012. – 47 с.

113. Khristunova, E.P. Investigation of electrochemical properties of silver nanoparticles conjugated with antibodies to tick-borne encephalitis for development of electrochemical immunosensor / E.P. Khristunova, E. Korotkova, B. Kratochvil, E. Dorozhko // *Izv. Vyss. Uchebnykh Zaved. Seriya Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya.* – 2020. – Vol. 63. – №. 4. – P. 28–33.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Алгоритм выполнения расчетов по оценке показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора

Алгоритм выполнения расчетов по оценке показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, $Abs@AgHЧ$ проводили в соответствии с РМГ 61-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки».

А.1 Оценка показателя повторяемости

Для оценки показателя повторяемости необходимо рассчитать среднее арифметическое результатов единичного анализа компонента (C_{cp}) по формуле:

$$C_{cp} = \frac{\sum C_{1,N}}{N}, \quad (A.1)$$

где N – число параллельных определений.

Далее необходимо рассчитать выборочную дисперсию для каждой серии анализа в условиях повторяемости:

$$S_1^2 = \frac{\sum (C_{1,n} - C_{cp})^2}{N-1}, \quad (A.2)$$

Затем необходимо проверить, можно ли пренебречь разбросом между сериями. Данную гипотезу проверяют по критерию Кохрена. Для этого необходимо из всех серий дисперсий выбрать наибольшее значение S_{max}^2 и найти сумму всех дисперсий $\sum S_1^2$.

Расчетные значения критерия Кохрена находят по формуле:

$$G_{расч} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_1^2}, \quad (A.3)$$

Табличное значение критерия Кохрена находят для принятой доверительной вероятности $P=0,95$, числа степеней свободы $v=N-1$ и $f=L$, где L – число суммируемых дисперсий.

Необходимо сравнить расчетное значение критерия Кохрена с табличным значением.

При $G_{\text{расч}} > G_{\text{табл}}$, значение S_{max}^2 исключают из расчетов и повторяют процедуру до следующего значения S_{max}^2 . Если при следующем максимальном значении дисперсии значение расчетного критерия Кохрена вновь больше табличного, то процедуру расчетов вновь повторяют, исключая текущее S_{max}^2 . Процедуру расчетов повторяют до тех пор, пока $G_{\text{расч}}$ не станет меньше или равно $G_{\text{табл}}$.

Оставшиеся (не исключенные) значения S_i^2 принимают однородными и далее оценивают по ним среднеквадратичные отклонения. По данным СКО устанавливают значение показателя повторяемости для полученных в конкретной лаборатории результатов анализа:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{L'}}, \quad (\text{A.4})$$

где L' - количество серий, оставшееся после проверки на однородность.

Полученное значение является СКО повторяемости $S_r = \sigma_r$.

A.2 Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности

Для оценки показателя внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) производят расчет общего среднего арифметического результатов анализа по формуле:

$$C = \frac{\sum C_i}{L'}, \quad (\text{A.5})$$

Далее в условиях промежуточной прецизионности рассчитывают СКО:

$$S_{RЛ} = \sqrt{\frac{\sum(C_{1,л} - C_l)^2}{L'-1}}, \quad (A.6)$$

Полученное значение $S_{RЛ} = \sigma_{RЛ}$ является показателем внутрилабораторной прецизионности.

А.3 Оценка показателя правильности (систематическая погрешность методики)

Для оценки показателя правильности разрабатываемой методики необходимо оценить систематическую погрешность при реализации данной методики. Для этого необходимо рассчитать разность между средним значением, полученным в лаборатории, и аттестованным значением образца (стандартный раствор):

$$\Theta = X - C, \quad (A.7)$$

Далее необходимо проверить значимость полученного значения по критерию Стьюдента. Для этого нужно рассчитать значение t-критерия ($t_{расч}$) и сравнить его с табличным значением ($t_{табл}$):

$$t_{расч} = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_{RЛ}^2}{L'} + \frac{\Lambda_0^2}{3}}}, \quad (A.8)$$

$\frac{S_{RЛ}^2}{L'}$ - дисперсия общего среднего результата

Λ_0 – погрешность аттестованного значения раствора

Рассчитанное значение t-критерия ($t_{расч}$) сравнивают с табличным значением ($t_{табл}$) при числе степеней свободы $f=L'-1$ для доверительной вероятности $P=0,95$.

При $t_{расч} < t_{табл}$ систематическая погрешность Θ не значима на фоне случайного разброса, и в данном случае ее принимают равной нулю, а оценку систематической погрешности проводят по формуле:

$$\Delta_{в,с}^* = \Delta_{н,с}^* = |\Delta_c^*| = |\Delta_c| = 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{RЛ}^2}{L'} + \frac{\Lambda_0^2}{3}} = 1,96 \cdot \sigma_c^*, \quad (A.9)$$

Где σ_c^* - СКО не исключенной систематической погрешности.

При $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$ систематическая погрешность Θ значима на фоне случайного разброса, поэтому ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах:

$$\Delta_{c(в,н)}^* = \Theta \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{RЛ}^2}{L'} + \frac{\Lambda_0^2}{3}} = \Theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^*, \quad (\text{A.10})$$

После расчета верхней и нижней границ систематической погрешности, выбирают максимальное по модулю значение $|\Delta_{\text{max}}^*| = |\Delta_{c,н}^*, \Delta_{c,в}^*| = \Delta_c^*$ и тогда можно записать:

$$\pm \Delta_c^* = \pm \Delta_c = \Theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^*, \quad (\text{A.11})$$

А.4 Оценка показателя точности (характеристики погрешности методики)

Для оценки показателя точности разрабатываемой методики необходимо рассчитать границы, в которых погрешность любого из совокупности результатов измерений при реализации методики находится принятой $P=0,95$. В данном случае дисперсия погрешности формируется из дисперсий случайной и систематической погрешностей.

Характеристику погрешности рассчитывают по формуле:

$$\Delta_{в}^* = \Delta_{н}^* = |\Delta^*| = |\Delta| = \Theta \pm 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma_{RЛ}^*)^2 + (\sigma_c^*)^2}, \quad (\text{A.12})$$

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Расчет показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата *Ab@AgHЧ*

Для оценки правильности и повторяемости разработанной разработанного электрохимического иммуносенсора проводили анализ 10 серий калибровочных образцов антител к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG", содержащих антитела к ВКЭ на 3 уровнях концентрации: 100, 400, 1600 Ед/см³.

Б.1 Содержание антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³ для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 1, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 3, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 2, правильности – в таблице 4.

Таблица 1 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Концентрация калиб. образца антител к ВКЭ, Ед/см ³	Погрешность Δ, Ед/см ³	Номер серии	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S ²
			1	2		
100	2,24	1	108	106	107	2
		2	108	104	106	8
		3	127	123	125	8
		4	109	114	111,5	12,5
		5	113	127	120	98
		6	97	101	99	8
		7	113	121	117	32
		8	95	103	99	32
		9	119	122	120,5	4,5
		10	124	130	127	18

Таблица 2 – Результаты расчета повторяемости для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

S^2_{\max}	ΣS^2	Г _{расч}	Г _{табл}	СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$
98	223	0,439	0,602	4,72

Таблица 3 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³ в условиях внутрилабораторной прецизионности

Общее среднее арифметическое по 10 сериям	113
СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R,Л} = \sigma_{R,Л}$	4,98

Таблица 4 – Оценивание систематической погрешности для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
13,2	6,48	2,262

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

$\Delta c(H) = \Theta - 1,96 * \sigma c$	$\Delta c(H) = \Theta + 1,96 * \sigma c$	$\pm \Delta^* c$
9,20659321	17,19340679	17,19340679

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 23,742$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием антител к ВКЭ 100 Ед/см³ (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты расчета метрологических характеристик для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_T		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности, $\pm \Delta_c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
100	4,72	4,17	4,98	4,40	17,2	15,2	23,8	21,0

Б.2 Содержание антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³ для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 6, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 7, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 8, правильности – в таблице 9.

Таблица 6 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Концентрация калиб. образца антител к ВКЭ, Ед/см ³	Погрешность Δ , Ед/см ³	Номер серии	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое \bar{e})	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2
			1	2		
400	8,96	1	418	421	419,5	4,5
		2	417	425	421	32
		3	396	402	399	18
		4	426	419	422,5	24,5
		5	435	417	426	162
		6	409	406	407,5	4,5
		7	424	421	422,5	4,5
		8	418	416	417	2
		9	398	403	400,5	12,5
		10	418	423	420,5	12,5

Таблица 7 – Результаты расчета повторяемости для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$
162	277	0,585	0,602	5,26

Таблица 8 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³ в условиях внутрилабораторной прецизионности

Общее среднее арифметическое по 10 сериям	416
СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R,Л} = \sigma_{R,Л}$	5,55

Таблица 9 – Результаты расчета правильности для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
15,6	2,86	2,262

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

$\Delta c(\text{н}) = \Theta - 1,96 * \sigma c$	$\Delta c(\text{н}) = \Theta + 1,96 * \sigma c$	$\pm \Delta^* c$
4,89101975	26,30898025	26,30898025

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 30,86$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием антител к ВКЭ 400 Ед/см³ (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты расчета метрологических характеристик для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_T		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности, $\pm \Delta_c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
400	5,26	1,27	5,55	1,33	26,3	6,3	30,9	7,4

Б.3 Содержание антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³ для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 11, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 12 результаты расчета повторяемости приведены в таблице 13, правильности – в таблице 14.

Таблица 11 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Концентрация калиб. образца антител к ВКЭ, Ед/см ³	Погрешность Δ , Ед/см ³	Номер серии	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое \bar{x})	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2
			1	2		
1600	35,85	1	1657	1662	1659,5	12,5
		2	1588	1581	1584,5	24,5
		3	1649	1637	1643	72
		4	1638	1623	1630,5	112,5
		5	1591	1607	1599	128
		6	1645	1639	1642	18
		7	1641	1651	1646	50
		8	1625	1617	1621	32
		9	1609	1614	1611,5	12,5
		10	1584	1598	1591	98

Таблица 12 – Результаты расчета повторяемости для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

S^2_{\max}	ΣS^2	Грасч	Гтабл	СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$
128	560	0,229	0,602	7,48

Таблица 13 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³ в условиях внутрилабораторной прецизионности

Общее среднее арифметическое по 10 сериям	1623
СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{RЛ} = \sigma_{RЛ}$	7,89

Таблица 14 – Результаты расчета правильности для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента		$\pm \Delta^*с$	$\pm \Delta^*$
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$	Ед/см ³	Ед/см ³
22,8	1,09	2,2622	40,9	43,7

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* незначима на фоне случайного разброса и её можно принять равной нулю.

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием антител к ВКЭ 1600 Ед/см³ (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты расчета метрологических характеристик для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности, $\pm \Delta_c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
1600	7,48	0,46	7,89	0,49	40,9	2,5	43,7	2,7

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Расчет показателей качества разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Ab_S@AgHЧ$

Для оценки правильности и повторяемости разработанной разработанного электрохимического иммуносенсора проводили анализ 10 серий калибровочных образцов антител к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG", содержащих антитела к ВКЭ на 3 уровнях концентрации: 100, 400, 1600 Ед/см³.

В.1 Содержание антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³ для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 1, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 3, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 2, правильности – в таблице 4.

Таблица 1 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Концентрация калиб. образца антител к ВКЭ, Ед/см ³	Погрешность Δ , Ед/см ³	Номер серии	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S ²
			1	2		
100	2,24	1	59	65	62	18
		2	99	101	100	2
		3	98	105	101,5	24,5
		4	58	69	63,5	60,5
		5	86	92	89	18
		6	77	71	74	18
		7	68	69	68,5	0,5
		8	69	76	72	32
		9	76	78	77	2
		10	74	71	72,5	4,5

Таблица 2 – Результаты расчета повторяемости для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

S^2_{\max}	ΣS^2	Г _{расч}	Г _{табл}	СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$
60,5	180	0,336	0,602	4,24

Таблица 3 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³ в условиях внутрилабораторной прецизионности

Общее среднее арифметическое по 10 сериям	78
СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R,Л} = \sigma_{R,Л}$	4,47

Таблица 4 – Оценивание систематической погрешности для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
22	11,48	2,262

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

$\Delta c(H) = \Theta - 1,96 * \sigma c$	$\Delta c(H) = \Theta + 1,96 * \sigma c$	$\pm \Delta^* c$
18,24342354	25,75657646	25,75657646

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 31,536$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием антител к ВКЭ 100 Ед/см³ (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты расчета метрологических характеристик для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 100 Ед/см³

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_T		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности, $\pm \Delta_c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
100	4,24	5,44	4,47	5,73	25,8	33,0	31,5	40,4

В.2 Содержание антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³ для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 6, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 7, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 8, правильности – в таблице 9.

Таблица 6 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Концентрация калиб. образца антител к ВКЭ, Ед/см ³	Погрешность Δ , Ед/см ³	Номер серии	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2
			1	2		
400	8,96	1	385	378	381,5	24,5
		2	405	413	409	32
		3	376	389	382,5	84,5
		4	359	368	363,5	40,5
		5	364	373	368,5	40,5
		6	370	381	375,5	60,5
		7	377	373	375	8
		8	403	413	408	50
		9	387	361	374	338
		10	421	415	418	18

Таблица 7 – Результаты расчета повторяемости для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$
338	696,5	0,485	0,602	8,35

Таблица 8 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³ в условиях внутрилабораторной прецизионности

Общее среднее арифметическое по 10 сериям	386
СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R,Л} = \sigma_{R,Л}$	8,80

Таблица 9 – Результаты расчета правильности для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
14,5	2,46	2,262

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

$\Delta c(n) = \Theta - 1,96 * \sigma c$	$\Delta c(n) = \Theta + 1,96 * \sigma c$	$\pm \Delta^* c$
2,935297119	25,96470288	25,96470288

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 35,18$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием антител к ВКЭ 400 Ед/см³ (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты расчета метрологических характеристик для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 400 Ед/см³

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_T		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности, $\pm \Delta_c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
400	8,35	2,16	8,80	2,28	25,96	6,7	35,1	9,1

В.3 Содержание антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³ для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 11, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 12 результаты расчета повторяемости приведены в таблице 13, правильности – в таблице 14.

Таблица 11 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Концентрация калиб. образца антител к ВКЭ, Ед/см ³	Погрешность Δ , Ед/см ³	Номер серии	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2
			1	2		
1600	35,85	1	1595	1602	1598,5	24,5
		2	1605	1587	1596	162
		3	1554	1562	1558	32
		4	1539	1523	1531	128
		5	1531	1557	1544	338
		6	1613	1607	1610	18
		7	1603	1611	1607	32
		8	1568	1578	1573	50
		9	1607	1588	1597,5	180,5
		10	1574	1564	1569	50

Таблица 12 – Результаты расчета повторяемости для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

S^2_{\max}	ΣS^2	Грасч	Гтабл	СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$
338	1015	0,333	0,602	10,07

Таблица 13 – Результаты анализа калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³ в условиях внутрилабораторной прецизионности

Общее среднее арифметическое по 10 сериям	1579
СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{RЛ} = \sigma_{RЛ}$	10,62

Таблица 14 – Результаты расчета правильности для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента		$\pm \Delta^*с$	$\pm \Delta^*$
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$	Ед/см ³	Ед/см ³
21,6	1,03	2,2622	41,1	46,1

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* незначима на фоне случайного разброса и её можно принять равной нулю.

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием антител к ВКЭ 1600 Ед/см³ (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты расчета метрологических характеристик для калибровочного образца с концентрацией антител к ВКЭ 1600 Ед/см³

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{RЛ}$		Показатель правильности, $\pm \Delta_c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
1600	10,1	0,64	10,6	0,67	41,1	2,6	46,1	2,9