

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 129 с., 56 рисунков, 26 таблиц, 71 источников, 1 приложение.

Ключевые слова: наночастицы серебра, биоконъюгаты, электрохимический иммуносенсор.

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

Цель работы – получить и исследовать биоконъюгаты на основе наночастиц серебра и использовать их в электрохимическом иммуноанализе.

В процессе исследования были определены некоторые параметры наночастиц серебра инструментальными методами (заряд, размер стабильность) и исследованы биконъюгаты методами УФ-спектроскопии, волтамперометрии, просвечивающей электронной микроскопии.

В результате исследования были получены и охарактеризованы инструментальными методами анализа наночастицы серебра и их биконъюгаты, подобраны рабочие условия определения наночастиц серебра на золото-ансамблевом электроде, собрана тестовая конструкция электрохимического иммуносенсора для определения антител против клещевого энцефалита.

Степень внедрения: данная работа находится на стадии научного исследования, результаты работы представлены и опубликованы в сборнике XVII Международной конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI» имени профессора Л. П. Кулева, а так же на второй Международной школе молодых учёных «НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ МАТЕРИАЛЫ» в виде постер-доклада.

Область применения: медицинские и диагностические учреждения

В будущем планируется разработать тест-систему для определения антител против клещевого энцефалита в биологических объектах (сыворотка крови человека).

Содержание

Введение	5
Глава 1 Литературный обзор.....	8
1.1 Сведения о наночастицах серебра	8
1.1.1 Получение наночастиц серебра.....	8
1.1.2 Характеристика наночастиц серебра	12
1.1.3 Применение наночастиц серебра	15
1.2 Биконъюгаты на основе наночастиц металлов	16
1.3 Сведения об иммуносенсорах.....	17
1.3.1 Принцип работы иммуносенсоров.....	19
1.3.2 Электрохимические иммуносенсоры	22
1.3.3 Применение иммуносенсоров	27
Глава 2 Материалы и методы исследования	30
2.1 Приборы и оборудование.....	30
2.2 Реактивы.....	32
2.3 Объекты исследования	33
2.4 Методы исследования.....	33
2.4.1 Получение наночастиц серебра.....	33
2.4.2 Получение биконъюгатов на основе наночастиц серебра с БСА	34
2.4.3 Получение биконъюгатов на основе наночастиц серебра с иммуноглобулином человеческого против клещевого энцефалита.....	34
2.4.4 Методика исследования наночастиц серебра и их биконъюгатов спектрофотометрическим методом.....	34
2.4.5 Методика исследования наночастиц серебра и их биконъюгатов оптическим методом.....	35
2.4.6 Методика исследования электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов.....	36
2.4.7 Методика определения общего заряда молекул методом электрофореза.....	39
Глава 3 Результаты исследования.....	41
3.1 Характеристика полученных наночастиц серебра	41
3.2 Характеристика биконъюгатов на основе наночастиц серебра	43

3.2.1 Характеристика биконъюгата на основе наночастиц серебра с БСА ..	43
3.2.2 Характеристика биконъюгатов на основе наночастиц серебра с иммуноглобулином человеческого против клещевого энцефалита	45
3.3 Определение электрического заряда полученных биконъюгатов	46
3.4 Разработка электрохимического иммуносенсора сенсора на основе биоконъюгатов наночастиц серебра.....	48
3.4.1 Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов на золото-ансамблевом электроде	48
3.4.2 Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов на тиолированных ЗАЭ	57
3.4.3 Разработка тестовой конструкции электрохимического иммуносенсора на основе биоконъюгата (наночастицы серебра с антителами против клещевого энцефалита)	58

Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение Ошибка! Закладка не определена.

4.1. Предпроектный анализ	Ошибка! Закладка не определена.
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	Ошибка! Закладка не определена.
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	Ошибка! Закладка не определена.
4.2 SWOT-анализ.....	Ошибка! Закладка не определена.
4.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации	Ошибка! Закладка не определена.
4.4 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования	Ошибка! Закладка не определена.
4.5 Инициация проекта	Ошибка! Закладка не определена.
4.6 Планирование управления научно-техническим проектом	Ошибка! Закладка не определена.
4.7 Бюджет научного исследования.....	Ошибка! Закладка не определена.
4.8 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	Ошибка! Закладка не определена.

Глава 5 Социальная ответственность Ошибка! Закладка не определена.

5.1 Производственная безопасность	Ошибка! Закладка не определена.
5.1.1 Анализ вредных и опасных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследования и обоснование мероприятий по их устранению.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.1.2 Отклонение показателей микроклимата	Ошибка! Закладка не определена.

5.1.3 Освещенность рабочей зоны	Ошибка! Закладка не определена.
5.1.4 Превышение уровня шума	Ошибка! Закладка не определена.
5.1.5 Электробезопасность.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.2 Экологическая безопасность.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.2.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду.	Ошибка! Закладка не определена.
5.2.2 Мероприятия по защите окружающей среды	Ошибка! Закладка не определена.
5.3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.1. Анализ вероятных ЧС, которые может инициировать объект исследований	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.2. Анализ вероятных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.3 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС	Ошибка! Закладка не определена.
5.4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение.....	62
Список используемых источников.....	64
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	72

Введение

Научно исследовательская работа (НИР) связана получением и исследованием биоконъюгатов на основе наночастиц серебра, которые в перспективе могут быть использованы при разработке иммуносенсоров.

Наночастицы серебра (НЧ) проявляют высокую антимикробную активность, что связано с их физико-химическими параметрами, такими как удельная поверхность, высокая адсорбционная способность и химическая активность [1]. Высокая связывающая способность НЧ серебра с молекулами белка позволяет использовать их для исследований в химико-биологических науках. В настоящее время изучаются многие свойства металлических НЧ в том числе при создании биосенсоров, где НЧ металлов используются, как метки для обнаружения высокоспецифичных белков. Кроме того последние работы посвящены разработке электрохимических иммуносенсоров на основе НЧ серебра и других благородных металлов [2].

Электрохимический иммуносенсор представляет собой датчик, который сочетает в себе иммунологические и электрохимические технологии для обнаружения антигена. Таким образом, он обладает преимуществами электрохимического датчика, в том числе высокой чувствительностью и низкой стоимости, а также, преимуществами иммунологического анализа, в том числе высокой селективности, специфичности и низких пределов обнаружения [3].

В случаях опасных вирусных инфекций, особенно важной является ранняя диагностика (на месте, в небольших клиниках). Огромной по важности в Сибирском регионе является вопрос быстрого обнаружения вируса клещевого энцефалита. Клещевой энцефалит является распространенным заболеванием региона с высокой смертностью. Ранняя диагностика является ключом к улучшению прогноза клещевого энцефалита, таким образом, является особенно важным выявление антител клещевого энцефалита в сыворотке крови, которые могут облегчить раннюю диагностику заболевания.

В настоящее время метод иммуноферментного анализа является одним из основных методов для обнаружения в сыворотке крови антител. Иммуноферментный метод анализа является многоступенчатым, где возможно получить ложные положительные результаты. Поэтому разработка быстрой, точной, низкой стоимости технологии для выявления в сыворотке крови антител против клещевого энцефалита крайне необходима. Привлечение иммуносенсоров, выступающих альтернативой в проведении анализов для определения специфичных антител, представляется весьма перспективным.

Объектами исследования в данной работе являются наночастицы серебра и их биконъюгаты.

Цель исследования: получение и исследование биоконъюгатов на основе наночастиц серебра.

Задачи исследования:

1. Получить НЧ серебра химическим восстановлением из раствора нитрата серебра, боргидридом натрия;
2. Определить параметры НЧ серебра инструментальными методами (заряд, размер, стабильность);
3. Получить биконъюгаты на основе модельного белка бычьего сывороточного альбумина (БСА) и на основе иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита; охарактеризовать их инструментальными методами анализа;
4. Исследовать электрохимические свойства наночастиц серебра и их биоконъюгатов на золото-ансамблевых электродах для дальнейшей разработки электрохимического иммуносенсора.

Научная значимость и новизна результатов

Впервые, получены биоконъюгаты на основе антител против клещевого энцефалита; собрана тестовая конструкция электрохимического иммуносенсора для определения антител против клещевого энцефалита, где

антиген иммобилизован на поверхность золото-ансамблевого электрода с обновляемой поверхностью.

Реализация и апробация работы

Результаты работы представлены и опубликованы в сборнике XVII Международной конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI» имени профессора Л. П. Кулева, а так же на второй Международной школе молодых учёных «Наноструктурированные материалы» в виде постер-доклада.

Глава 1 Литературный обзор

1.1 Сведения о наночастицах серебра

1.1.1 Получение наночастиц серебра

Нанотехнология на сегодняшний день занимает важное место в поле современных исследований, которые занимаются конструированием, синтезом и манипулированием структурами частиц в интервале от 1-100 нм [4]. Одним из главных направлений в исследованиях нанотехнологии, является синтез наночастиц отличающихся по химическому составу, размеру и морфологии. Синтез наночастиц серебра может быть осуществлен и стабилизирован химическими, физическими и биологическими методами. К наиболее распространенным физическим методам относят испарение-конденсация и лазерное выжигание [5]. Одно из главных преимуществ в сравнении с химическими методами это отсутствие загрязнения растворителя и однородность получаемых наночастиц. Физические методы имеют и некоторые недостатки, например, при синтезе НЧ серебра в трубчатой печи при атмосферном давлении, главными недостатками является, что печь занимает много пространства, потребляет большое количество энергии и требует большого количества времени для достижения термической стабильности. Альтернатива получать НЧ при помощи небольшого керамического нагревателя используемого для испарения исходных материалов, где испарение происходит вблизи поверхности нагревателя.[5] Использование нагревателя делает возможным формирование стабильных наночастиц с высокой концентрацией, так как температура поверхности нагревателя не меняется со временем. Результаты экспериментов показывают, что диаметр, стандартное отклонение и концентрация наночастиц увеличивается от значения температуры поверхности нагревателя [6].

Серебряные НЧ могут быть синтезированы методом лазерного выжигания сыпучих металлических материалов в растворе [7].

Эффективность выжигания и характеристика производимых НЧ зависят от многих параметров, включая длину волны лазера столкнувшуюся с металлической целью, длительность лазерных импульсов, продолжительность выжигания. Одним из важных преимуществ использования этой техники в сравнении с другими методами производства коллоидных металлов, является отсутствие химических реактивов в растворе. В работе [8] авторы используют метод дугового разряда для получения суспензии НЧ в деионизированной воде без добавления поверхностно-активных веществ. В этом синтезе серебряные провода (1мм в диаметре) погружали в деионизированную воду и использовали в качестве электродов. В другой работе [9] авторы показали получение НЧ серебра путем прямого распыления металла в жидкую среду. Метод объединяет физическое осаждение металла в глицерине и мокрую технику химического синтеза. В результате использования этой техники наночастицы получаются круглой формы с диаметром около 3,5 нм и стандартным отклонением 2,4 нм.

В настоящее время существует необходимость в разработке экологически и экономически чистых процессов производства наночастиц, а не использование токсичных химикатов. В этой области отлично зарекомендовали себя микроорганизмы, которые могут участвовать в синтезе наночастиц. Некоторые примеры включают в себя производство НЧ с использованием бактерии для золота, серебра, кадмия, цинка, магнетита; дрожжей для серебра, свинца и кадмия; грибов для золота, серебра и кадмия; водорослей для серебра и золота [10]. Размером и морфологией НЧ можно управлять с помощью некоторых критических условий, включающих: pH, свет, температуру, донора электронов, биомассу, концентрацию субстрата и другое. В таблице 1.1 показаны основные микроорганизмы и биологические системы, синтезирующие наночастицы серебра [11].

Таблица 1.1 Примеры организмов используемых для синтеза НЧ серебра

Бактерии	Растения	Грибы	Водоросли
----------	----------	-------	-----------

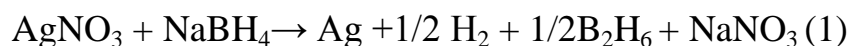
<i>Aeromonas sp.</i> SH10	<i>Aloe vera leaf extract</i>	<i>Nitrate reductases</i>	<i>Spirulina plantensis</i>
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Azadirachta indica</i>	<i>Phaeneroechaete chrysosporim</i>	<i>Oscillatoria willei</i>
<i>Lactobacillus strains</i>	<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Gelidiella acerosa</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AG259	<i>Emblica Officinalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Corynebacterium sp.</i> SH09	<i>Pelargonium graveolens leaves</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pinus eldarica</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	

Бактерии были исследованы для получения НЧ серебра. Известно, что высокостабильное серебро (40нм) может быть синтезировано путем биовосстановления водных растворов ионов серебра с культурой супернатанта непатогенных бактерий, *Bacillus licheniformis* [12]. Серебряные нанокристаллы с различной формой были успешно синтезированы *Pseudomonas stutzeri* [13]. В других исследованиях показано использование бактерий *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter cloacae* для быстрого биосинтеза металлических частиц наносеребра через восстановление ионов серебра в культуре [14]. Наночастицы серебра (5-50 нм) могут быть синтезированы внеклеточно с *Fusarium oxysporum* (грибок), без признаков флокуляции частиц даже через месяц после реакции. Долгосрочная стабильность наночастиц может быть обусловлена стабилизацией серебряных частиц белками. Морфология НЧ сильно варьирует от сферической формы до треугольной. Серебро взаимодействует с белками включающих цитохром *c*, этот белок может самоагрегироваться на поверхности цитратной оболочки коллоидного серебра [15].

Получение частиц с помощью растений является экономически эффективным методом, который может быть использован для крупномасштабного производства [16]. Экстракт *Camellia sinensis* (зелёный чай) может быть использован как восстанавливающий и стабилизирующий агент для биосинтеза наночастиц серебра [17]. Биомолекулы фенольных кислот (кофеин, теофиллин) представленные в экстракте *Camellia sinensis* ответственны за формирование и стабилизацию наночастиц серебра. Экстракты листьев черного чая могут тоже производить наночастицы серебра [18].

Химические методы чаще всего используются для получения (НЧ), а химическое восстановление является наиболее часто используемым методом для получения стабильных коллоидных дисперсий, в воде или органическом растворителе. Для реализации этого процесса необходимо наличие органических или неорганических восстановительных агентов. Типичные восстанавливающие агенты тетрагидридоборат натрия (боргидрид, NaBH_4), гидразин (N_2H_4), цитрат натрия и N,N-диметилформамид. Выбор агента может значительно повлиять на размер и стабильность наночастиц серебра [19].

Боргидридный метод является универсальным для получения стабильного коллоидного серебра. Это объясняется более высокой восстановительной способностью тетрагидридобората натрия и простотой воспроизведения. Боргидрид одновременно выступает и восстановителем и стабилизатором образующихся частиц [20]. Химическая реакция при восстановлении нитрата серебра боргидридом:



Этот метод позволяет получить частицы размером $12 \pm 2 \text{ нм}$. Механизм распределения наночастиц в боргидридной оболочке представлен на рисунке 1.1.

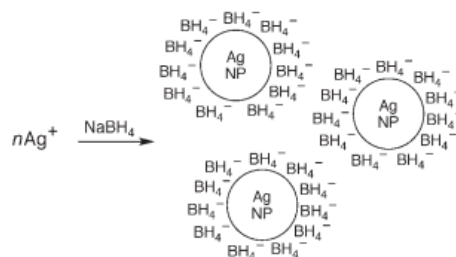


Рисунок 1.1 – Распределение наночастиц в боргидридной оболочке

1.1.2 Характеристика наночастиц серебра

Серебряные наночастицы обладают уникальными оптическими, электрическими и тепловыми свойствами. Широко находят применение при создании биологических и химических датчиков, токопроводящих чернил, паст и наполнителей, которые используют наночастицы серебра благодаря их высокой электропроводности, стабильности и низким температурам спекания [21]. Кроме того используются при молекулярной диагностики и в фотонных устройствах, которые используют преимущества оптических свойств наночастиц серебра. Все более и более распространенной областью применения является использование наночастиц серебра для антимикробных покрытий и многих текстильных изделий, клавиатур, перевязочных и биомедицинских устройств [22].

Для осуществления характеристики наночастиц важно понимать и контролировать синтез наночастиц и их свойства. Характеристика выполняется с использованием различных методик например; пропускающая и сканирующая электронная микроскопия (ПЭМ и СЭМ), атомно-силовая микроскопия (АСМ), методом динамического рассеяния света, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, инфракрасная спектроскопия на основе преобразования Фурье (ИК) и УФ-спектроскопия [23]. Эти методы используются для определения различных параметров, таких как размер частиц, форма, кристалличность, фрактальная размерность, размера пор и площади поверхности.

Например, морфологию и размер частиц можно определить с помощью ПЭМ, СЭМ и АСМ. Преимущество по сравнению с

традиционными АСМ микроскопами, таких как SEM и TEM, что АСМ измеряет трехмерные изображения таким образом, чтобы возможно было рассчитать высоту частиц и объем [24]. Кроме того, динамическое рассеяние света используется для определения распределения частиц по размерам. Кроме того, дифракция рентгеновских лучей используется для определения степени кристалличности, в то время как в УФ-видимой спектроскопии используется для подтверждения образования образца, показывая поглощение наночастиц при определенной длине волны [25].

Оптические свойства наночастиц серебра

Существует растущий интерес к использованию оптических свойств наночастиц серебра в качестве функционального компонента в различных продуктах и датчиков. Для наночастиц серебра характерен эффект плазмонного резонанса и, в отличие от многих красителей и пигментов, имеют цвет, который зависит от размера и формы частиц [26]. Устойчивое взаимодействие наночастиц серебра со светом происходит потому, что коллективное электронное возбуждение электронов при действии света на определенных длинах волн (рис 1.2) [27].

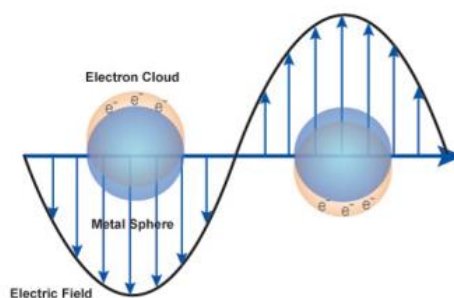


Рисунок 1.2 – Эффект плазмонного резонанса наночастиц серебра

Поскольку колебания заряда, связанные с поверхностным плазмоном, затухают с превращением энергии колебаний в тепло, имеет место также поглощение энергии электромагнитной волны. Сечение рассеяния позволяет легко визуализировать наночастицы размером 100 нм с

помощью обычного микроскопа. При 60 нм наночастицы серебра подсвечиваются белым светом они проявляются как яркие рассеиватели в виде синий точечных источников в темном поле микроскопа (рис 1.3) [28].

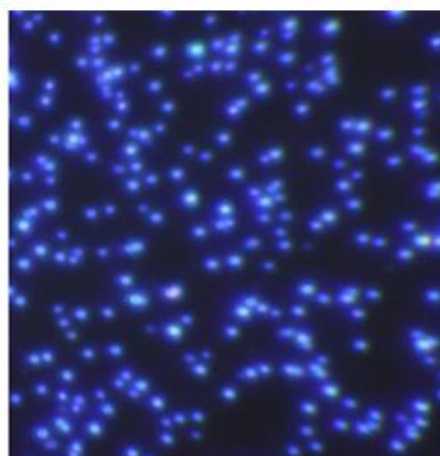


Рисунок 1.3 – Изображение темнопольной электронной микроскопии (перепечатано из Aldrich Prod. No. 730815)

Из-за уникальных оптических свойств наночастиц серебра, большое количество информации о физическом состоянии наночастиц может быть получено путем анализа спектральных свойств наночастиц серебра в растворе. Спектральный отклик наночастиц серебра показан на рисунке 1.4. [20].

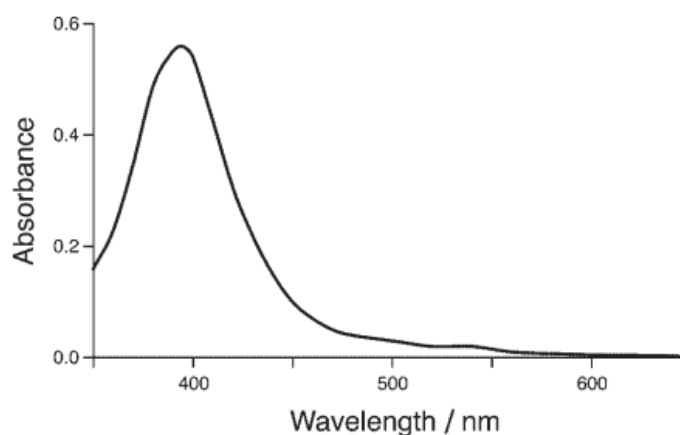


Рисунок 1.4 - Спектр поглощения наночастиц серебра

Кроме того, УФ-видимая спектроскопия обеспечивает механизм для мониторинга, как наночастицы изменяются с течением времени, поэтому

возможно ее использование при определении какой-либо агрегации наночастиц в растворе.

1.1.3 Применение наночастиц серебра

Серебряные наночастицы используются в многочисленных технологиях и включены в широкий спектр потребительских продуктов, которые используют их оптические, проводящие и антибактериальные свойства [29].

Области применения:

1) Здравоохранение и медицинской техники: наночастицы серебра используются при создании биосенсоров и в многочисленных анализах, где они могут быть использованы в качестве биологических меток для количественного определения.

2) Пищевая и текстильная промышленность: наночастицы серебра содержатся в одежде, обуви, красках, бытовой техники, косметики и пластмассы для обеспечения антибактериального эффекта.

3) Техносфера: наночастицы серебра используются в проводящих чернилах и интегрированы в композиты для повышения тепло и электропроводности.

Существует растущий интерес к пониманию взаимосвязи между физическими и химическими свойствами наноматериалов и их потенциального риска для окружающей среды и здоровья человека. Наличие таких возможностей управления свойствами наночастиц (размер, форма, и поверхности) позволяет лучшей их корреляции к токсическим эффектам. Монодисперсные, не агрегированные наночастицы с точно определенными физическими и химическими характеристиками могут быть использованы, чтобы понять, как наночастицы взаимодействуют с биологическими системами и окружающей средой. В связи с увеличением распространенности применения наночастиц серебра в потребительских продуктах, важен контроль до стадии реализации, чтобы проверить

безопасность серебра в виде наночастиц и понять механизм действия противомикробных эффектов. Коллоидное серебро используется в течение многих десятилетий, но детальные исследования его влияния на окружающую среду только начались.

1.2 Биконъюгаты на основе наночастиц металлов

Наночастицы благородных металлов являются привлекательными для биомаркировки и биовизуализации. [30]. Причиной такого интереса являются, с одной стороны, уникальные физико-химические свойства данных частиц которые, строго говоря, разительно отличаются от свойств объемного материала: в случае наночастиц начинают преобладать квантово-размерные эффекты, изменяются химические и физические свойства [31]. С другой стороны, наночастицы металлов имеют огромный потенциал для их широкого практического применения. Одним из таких примеров могут служить наночастицы серебра, которые являются одним из самых интересных неорганических материалов с точки зрения возможности их применения в медицине [30], что вызвано их уникальными оптическими электрическими и противомикробными свойствами.

Избирательный поиск интересующих молекул, субстратов или областей наиболее важный при биомаркировки и биовизуализации. Создание биоконъюгатов наночастиц благородных металлов (Ag, Au, Pt) – это одна из возможностей синтеза новых комплексов с уникальными характеристиками [32] Свойства биоконъюгатов напрямую зависят от вида субстрата и типа наночастиц. Благодаря соответствующей площади поверхности большинство благородных наночастиц проявляют высокую транспортную способность и могут быть использованы в качестве электрохимических меток [33]. Наночастицы благородных металлов демонстрируют высокую стабильность, хорошую биосовместимость, и более низкую цитотоксичность и могут быть использованы для адресной доставки. Цитотоксичность и биосовместимость являются двумя важными факторами при создании биомаркеров в живых

клетках, органах и организмах. Они влияют на время удержания наночастиц в живых клетках, органах и организмах, а также время доставки. Например, наночастицы золота модифицированные полиэтиленгликолем (ПЭГ) могут увеличить время циркуляции в крови по сравнению с наночастицами золота без какой-либо модификации поверхности. ПЭГ обеспечивает биосовместимые свойства, для уменьшения поглощения живых клеток во время циркуляции крови [34].

Конъюгированная биомолекула с наночастицами благородных металлов может использоваться для обнаружения раковых клеток, опухолей [35]. Металлы выступающие, как метки в этих молекулах, позволяют диагностировать патологические изменения, на ранних этапах развития заболевания. Данные свойства использования биконъюгатов подчеркивают важность исследований в области создания биконъюгатов.

1.3 Сведения об иммуносенсорах

Иммунологические исследования играют важную роль в количественной оценке целевых молекул в клинических и биологических образцах. Выявление и идентификация микробных агентов, является одной из сложных задач в современных науках. Кроме того одним из аспектов проблем современного общества, является профилактика и лечение на ранних стадиях заболеваний и даже предотвращение смертей из-за возможной биотеррористической атаки. В наше время для решения этих проблем доступны соответствующие процедуры анализа: полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), масс-спектрометрия и другие. Однако медленная работа, сложная портативность и высокие эксплуатационные расходы ограничивают широкое применение данных методов анализа. Анализ на возбудителей усугубляются еще за счет небольших различий между распространенными и опасными микроорганизмами. Создание различных биосенсоров выступает в качестве альтернативы для решения этих целей, интерес в настоящее время

сосредоточен на анализе пищевых патогенов и контроле воды [36]. Фокус на обнаружение биоагентов возник из военных времен, однако, для спасательных служб и служб безопасности, охране общественных зданий и национальной безопасности возможно использование биосенсоров тоже.

Биосенсоры могут быть использованы для определения различных аналитов (не обязательно биологической природы), в то время как иммуносенсоры направлены главным образом на обнаружение определенных антител или антигенов в жидкостях организма, особенно в сыворотке крови. Из-за этого ставится под сомнение использование иммуносенсоров для определения аналитов в различных средах (например определение тринитротолуола в грунтовых водах, через формирование комплексов антитела-тринитротолуол). Таким образом чувствительными биологическими элементами в иммуносенсорах являются антигены и антитела (хотя это могут быть и аптамеры – одноцепочные молекулы ДНК, которые работают как искусственные антитела, образуя аптамер-аналит комплексы) [37].

Как уже говорилось ранее, иммуносенсоры могут быть разработаны для обнаружения либо антител, либо антигенов. Тем не менее обнаружение антител является предпочтительным, поскольку применение антител в качестве чувствительных биологических элементов может привести к потере сродства вследствие иммобилизации антител на поверхности электрода. Из-за высокой устойчивости комплекса антитело-антиген, предполагается одноразовое использование иммуносенсора, в этом и состоит основная проблема при реализации. Потому что некоторые датчики стоят дорого, существует большое беспокойство в регенерации иммуносенсоров, главным образом путем промывки с соответствующим раствором высокой ионной силы или низким рН. Передача сигнала в иммуносенсорах может осуществляться различными способами, используя различные изменения свойств или генерации сигнала, который происходит после образования комплекса антиген-антитело. Хотя существует много видов датчиков

преобразования сигнала, чаще всего используются механизмы преобразовательные связаны с измерением электронов, фотонов и масс [38]. Другие механизмы передачи сигнала включают тепловые изменения и изменение pH. Таким образом, основные датчики, используемые в иммуносенсорах [39]:

1) Электрохимические преобразователи. В этом случае измеряется электрический сигнал, который показывает значительные различия по величине, если образуются комплекс антиген-антитело. Основные электрохимические преобразователи амперометрическое (измерение тока), потенциометрический (измерение потенциала электрода или разности потенциалов) и кондуктометрические (измерение проводимости или сопротивления).

2) Оптические датчики. В этом случае, оптический сигнал генерируется за счет изменения цвета или флуоресценция или изменение оптических свойств окружения, вследствие образование комплекса антиген-антитело.

3) Пьезоэлектрические преобразователи. Образование комплексов антиген-антитело предполагает увеличение массы по сравнению с антигеном или только антитела, которые детектируют с пьезоэлектрических устройств, таких, как кварцевые микровесы или кантилевера.

1.3.1 Принцип работы иммуносенсоров

Благодаря хорошей чувствительности и непрерывной функции мониторинга иммунохимические устройства предпочтительны для обнаружения микробных агентов. Классификация иммунохимических методов анализа приведена на рисунке 1.5.

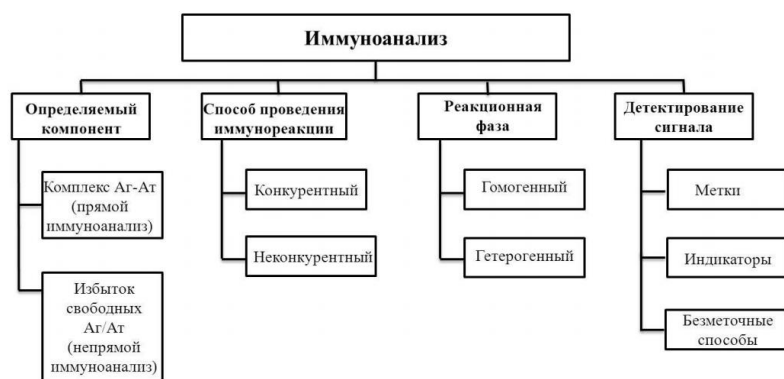


Рисунок 1.5 – Классификация иммунохимических методов анализа

При использовании иммуносенсоров нет необходимости в извлечении генетического материала от биоагентов, которое является обязательным в других методах анализа. Анализ основан на использовании антител обладающих молекулярной специфичностью и высоким сродством к определенному антигену.

Иммунологические исследования благодаря специфичному распознаванию находят применение даже в сложных матрицах, из-за их селективности взаимодействия «антитело-антиген» [40]. Принцип работы иммуносенсоров отображен на рисунке 1.6. К другим положительным факторам использования относится высокая чувствительность, простота конструкции и мобильность распознаваемого элемента.

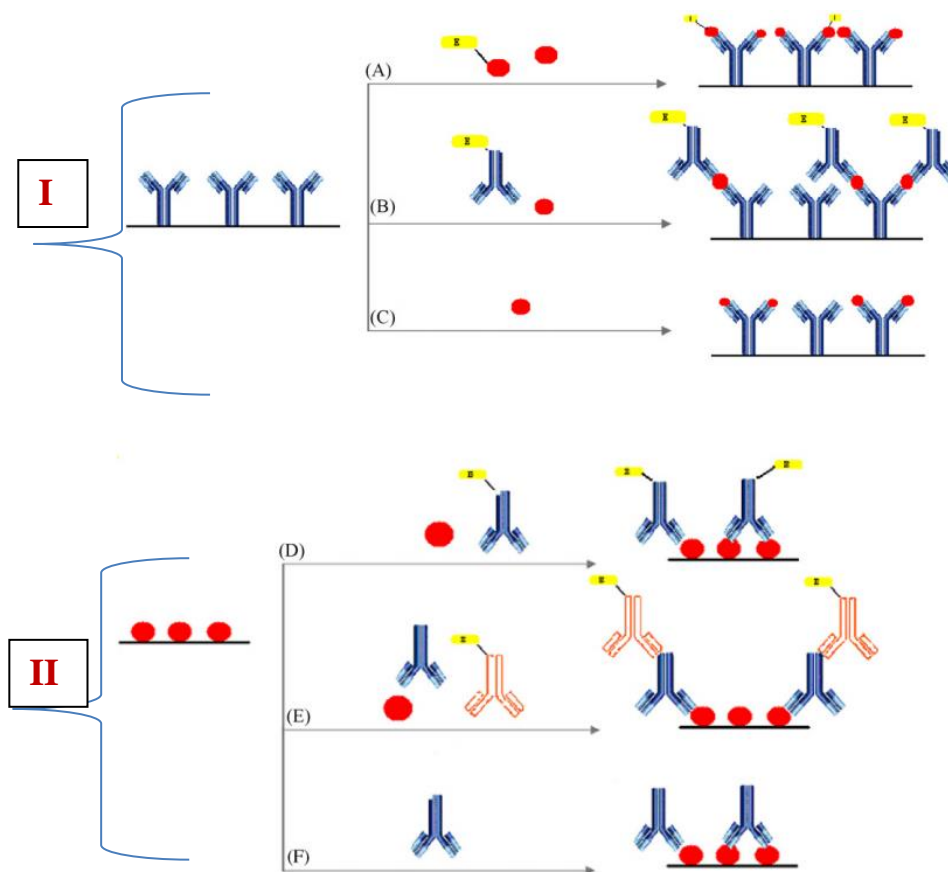


Рисунок 1.6 – Принцип работы иммуносенсоров, I- антитела иммобилизованы на подложку; II – антигены иммобилизованы на подложку: (A) метод прямого конкурентного анализа с использованием антигена меченого ферментом; (Б) сэндвич-анализа с помощью обнаружения антител, меченных ферментом; (С) прямой анализ: (д) прямого конкурентного анализа с использованием первичных антител, меченных ферментом; (Е) непрямого конкурентного анализа с использованием вторичных антител, меченных ферментом. (Ф) метод прямого опробования

Согласно рисунку 1.6 принцип работы иммуносенсоров происходит по двум путям: в первом антитела выступают, как элементы иммунораспознавания на поверхности электрода; во втором случае антигены. Во втором случае молекула антигена должна быть иммобилизована на электроде, а ковалентная связь является предпочтительным вариантом связывания. Голые металлы и углеродные электроды способны адсорбировать белки, включая антитела, но полученные слои недостаточно

устойчивы, так как происходит медленное спонтанное высвобождение белков с поверхности электрода. Для решения этой проблемы было предложено сначала химически активировать поверхность электрода: 1 - путем нанесения благородных металлов на электроды (золото, платина); 2- тиолирование поверхности электрода, 3 - взаимодействия между аминогруппами тиоловых соединений с глутаровым альдегидом; 4- иммобилизация антигена на гистидиновом хвосте глутарового альдегида; 5 - блокирование электрода от неспецифичных связываний (рис. 1.7) [41].

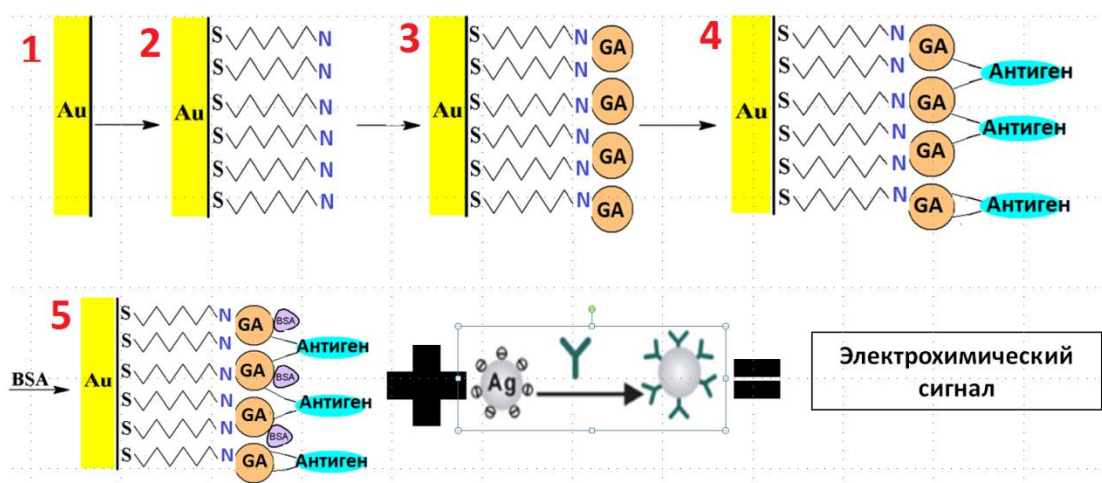


Рисунок 1.7 – Химическая активация поверхности электрода

После активации поверхности в результате аффинного распознавания происходит взаимодействие со специфичными антителами. В результате чего регистрируется электрохимический сигнал. Чаще всего используются антитела класса (IgG) и редко класса IgM. Антитела это фрагменты, изготовленные из нативных антител путем химического и протеиназного расщепления, а так же рекомбинантные антитела, которые могут обеспечить высокую плотностью сайтов связывания к поверхности иммуносенсора [40].

1.3.2 Электрохимические иммуносенсоры

Принципы работы электрохимических иммуносенсоров хорошо известны и описаны в работах [41,42]. Несколько электрохимических методов (потенциометрический, амперометрический, и

кондуктометрический) могут быть применены для аналитических целей, в создании электрохимического иммуносенсора. Однако, системы обнаружения амперометрического сигнала были достаточно хорошо продемонстрированы, чтобы быть самым подходящим средством при регистрации сигнала от иммуносенсора. Обнаружение амперометрического сигнала основано на измерении тока при фиксированном (методика потенциостатических анализов) или переменном (метод вольтамперометрии) потенциале, где в классическом стиле включает в себя трех-электродную систему, хотя во многих устройствах это часто сводится на практике к двум электродам[43].

За счет разности потенциалов между рабочим и электродом сравнения, происходят измерения, где интересующие соединения либо окисляются, либо восстанавливаются на поверхности рабочего электрода, вызывая тем самым процесс переноса электронов. Электроды, как правило сделаны из инертных металлов, таких как платина, золото, или углерода, либо в виде графита (сплошного или в виде пасты). Эти электроды обычно используются для обнаружения химических соединений, полученных или израсходованных в результате каталитической реакции. Следовательно, для конструкции амперометрических иммуносенсоров необходимы электрохимически активные метки, которые передают сигнал напрямую или как продукт ферментативной реакции. С тех пор как стало известно, что ферментные метки обеспечивают большое усиление сигнала в анализе, в продаже появилось большое количество биконъюгатов, так как большинство амперометрических иммуноферментных анализов базируется на использовании специфических пар фермент/субстрат [44].

В Таблице 1.2 представлены пары фермент/субстрат, которые обычно используются для обнаружения комплекса в электрохимических измерениях [44].

Таблица 1.2 – Пары фермент/субстрат наиболее используемые в амперометрических иммуносенсорах

Фермент	Субстрат	Потенциал (рабочий электрод)
Щелочная фосфатаза (Alkaline phosphatase, ALP)	p-Aminophenyl phosphate (PAPP)	+ 150мВ (углерод)
Щелочная фосфатаза (Alkaline phosphatase, ALP)	p-Aminophenyl phosphate (PAPP)	+550мВ (стеклоуглерод)
Щелочная фосфатаза (Alkaline phosphatase, ALP)	Фенил фосфат	+880мВ (платина)
<u>Глюкозооксидаза</u> (Glucose Oxidase)	Глюкоза /O ₂	+650 мВ (платина)
Пероксидаза (Peroxidase)	Гидрохинон/пероксид водорода	-300 мВ (платина, золото)
Пероксидаза (Peroxidase)	Ферроцен уксусная кислота/пероксид водорода	-300 мВ (стеклоуглерод)
Пероксидаза (Peroxidase)	Тетраметилбензидин/ пероксид водорода	-300 мВ (стеклоуглерод)

Системы электрохимических измерений являются весьма чувствительными и довольно дешевыми, кроме того уже существуют портативные форматы. Прогресс в электронике позволяет миниатюризировать все электрохимические системы одиночного-чип формата; встроенный с цифровым управлением потенциостат LMP91000 (Техас инструмент) является запрограммированным через последовательный интерфейс (I2C) и потребляет минимум электроэнергии. Даже передовые импульсные, вольтамперометрические и гальваностатическом техники доступны в ручных инструментах в нескольких компаниях: PalmSens и

EmStat (Palm), μ Stat (DropSens), PG581 (Uniscan)[45], а также другие прототипы уже разработаны в лабораториях, как за рубежом, так и в пределах страны.

В Российской Федерации уже были опубликованы данные о сборке электрохимического иммуносенсора для диагностики клещевого энцефалита. (г.Екатеринбург, 2003 год). Между проводимыми исследованиями в рамках нашей работы и опубликованных данных есть серьезные отличия. Во-первых ими был иммобилизованы антитела непосредственно на поверхность углеродсодержащего электрода с последующей иммобилизацией антигена и антител в качестве нового биологического слоя «сэндвича». Полученная конструкция сэндвич системы инкубировалась в растворе белка А меченного либо золото либо серебром, приобретенных в компании производства (Sigma), а не синтезированный в рамках работы. Работу проводили по механизму непрямого конкурентного анализа с использованием вторичных белков, меченных металлом. Опираясь на существенные отличия в методике проведения экспериментов, можно утверждать о научной новизне представленной работы [46].

Магнитно-электрохимические иммуносенсоры

В последнее время находят применение и магнитно-электрохимические иммуносенсоры, в основе которых лежат электрохимические сенсоры с иммуномагнитными микросферами. Одним из этапов анализа является иммуномагнитная сепарация клеток. В основу метода магнитной сепарации клеток входит использование парамагнитных бус (микросфер), покрытых моноклональными антителами против поверхностного антигена, специфичного для интересующих клеток (рис 1.8) [47].



Рисунок 1.8 – Методика выделения клеток методом магнитной сепарации

Магнитные бусы невидимы при световой микроскопии и имеют диаметр около 50нм, подвергаются биодegradации и не травмируют клетки [48]. Метод позволяет осуществлять выделение интересующей популяции клеток из цельной крови, образцов клеток костного мозга или мононуклеарной суспензии, что обеспечивает быстрый и прямой доступ к максимальному числу целевых клеток.

Метод магнитной сепарации предоставляет неограниченные возможности по выделению любой интересующей клеточной популяции. Иммуномагнитные микробусы позволяют осуществить либо положительную, либо отрицательную селекцию нужных клеток (как из клеточной суспензии, так и из цельной крови). При положительной селекции выделяемые клетки связываются с бусами, покрытыми моноклональными антителами, поверхностными маркерами данного типа клеток, а лишние клетки удаляются. При отрицательной селекции с магнитными микробусами, нагруженными моноклональными антителами, связываются клетки, которые нужно удалить. Выделяемая популяция клеток остается в клеточной суспензии. Используя этот подход, который сочетает в себе селективность антител с чувствительностью электрохимического обнаружения, можно добиться заметного улучшения в классических методах иммунного анализа.

1.3.3 Применение иммуносенсоров

Анализ литературных данных показывает, что важно проводить мониторинг соединений, присутствующих при производстве медицинских препаратов, гормонов и патогенов. Учитывая этот факт некоторые электрохимические иммуносенсоры нашли свое применение для обнаружения афлотоксинов (AFB1, AFM1) в кукурузе ячмене и молоке [49]. В частности определения AFB1 происходит по механизму непрямого конкурентного анализа с использованием вторичных антител, меченных ферментом (рис.1.6 Е). Специфичность метода была оценена путем изучения перекрестной реактивности моноклональных антител по отношению к другим афлатоксинам. Результаты показали, что моноклональные антитела могут легко отличить AFB1 от других токсинов, за исключением AFG1. Еще одни электрохимические иммуносенсоры был предложен Микели и др. для обнаружения AFM1 в молоке [50]. Для этого был использован амперометрический иммуносенсор работающий по механизму прямого конкурентного анализа с использованием антигена меченного ферментом (рис.1.6 А). Предложенная система была сравнена со спектрофотометрическим иммуноферментным анализом. В результате были получены аналогичные результаты, но с преимуществом короткого времени анализа в случае иммуносенсора.

Одним из направлений прогресса в области технологии генной инженерии, является введение и экспрессия новых генов в сельскохозяйственные культуры, с целью получения полезных признаков, таких как насекомо- и болезнестойчивость. Одним из ярких примеров является получение трансгенной кукурузы [51]. Для этого три трансгенных линии Чешуекрылых, устойчивых к кукурузе (Bt-11, MON-810, Bt-176) экспрессируют гены токсичных белков *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ab (Bt-11, MON-810) и Cry 1Ac (Bt-176) [52]. Продукты содержащие ГМО > 0.9% , должны быть маркированы и для реализации быстрых методов количественного обнаружения могут быть использованы иммуносенсоры.

Недавно был разработан иммуномагнитный электрохимический датчик для обнаружения Vt-Cry 1AB / Cry1Ac белков в генетически модифицированных образцах кукурузы. Датчик основан на использовании магнитных микросфер, анализ происходит по механизму сэндвич-анализа с помощью обнаружения антител, меченных ферментом (рис. 1.6 Б) [53].

Обнаружение раковых опухолей на ранних стадиях заболевания, является важным моментом для медицины по всему миру. Рак поджелудочной железы является распространенным видом рака с высокой смертностью [54]. Из-за отсутствия ранних диагностических и прогностических маркеров, более 80% с клинически подтвержденным раком поджелудочной железы диагностируется на поздних стадиях, поэтому возникают ограничения доступности вариантов лечения [54]. Ранняя диагностика является ключом к улучшению прогноза рака поджелудочной железы, но есть еще отсутствие клинически эффективных методов неинвазивного скрининга. Таким образом, является особенно важным выявление новых маркеров в сыворотке крови, которые могут облегчить раннюю диагностику рака поджелудочной железы.

Трипсин представляет собой пищеварительный фермент, который селективно гидролизует полипептидные цепи лизина или аргинина, а также участвует в инвазии и метастазировании рака поджелудочной железы, способствуя деградации внеклеточного матрикса [55]. Кроме того, трипсин может также активировать протеазы активированный рецептор 2 (PAR-2), чтобы стимулировать пролиферацию клеток поджелудочной железы и адгезии [55].

Таким образом, панкреатический трипсин в сыворотке может быть использован в качестве маркера рака поджелудочной железы [56]. Новые высокочувствительные и неинвазивные методы обнаружения в сыворотке крови трипсина крайне необходимы для обеспечения мониторинга для лиц с высоким уровнем риска. В настоящее время технология обнаружения в сыворотке крови трипсина является методом ИФА, поэтому разработка быстрой, точной технологии низкой стоимости для выявления в сыворотке

крови трипсина крайне необходима. Этот метод является многоступенчатым процессом и возможно получить ложные положительные результаты. Электрохимический иммуносенсор представляет собой датчик, который сочетает в себе иммунологические и электрохимические технологии для обнаружения антигена. Таким образом, он обладает преимуществами электрохимического датчика, в том числе высокой чувствительностью и низкой стоимости, а также, преимуществами иммунологического анализа, в том числе высокой селективности, специфичности и низких пределов обнаружения [57]. Иммуносенсоры крайне редко применяются в медицинской практике, но возможность определения уровня сывороточного трипсина с использованием углеродного модифицированного электрода, уже доказана, а значит и возможность определения раковых клеток на ранних стадиях заболеваний [58].

В этой главе описаны далеко не все возможности применения иммуносенсоров, так как их области обширны. На рис. 1.9 представлена динамика публикационной активности по запросу «immunosensor» базы данных Scopus в последние годы.

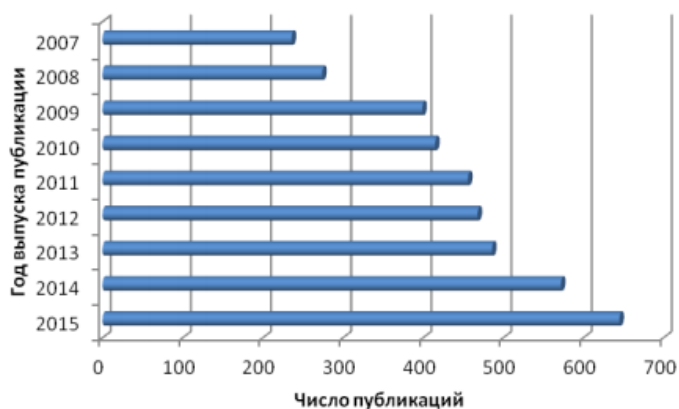


Рисунок 1.9 – Динамика изменения публикационной активности по запросу «immunosensor»

Можно наблюдать, что есть растущая тенденция в их применении, несмотря на сравнительно небольшое число публикаций от общего количества. Разные виды иммуносенсоров можно разработать для работы под конкретные условия и для решения разного рода проблем.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Приборы и оборудование

Оборудование:

1) Спектрофотометр УФ-видимой области (Agilent Cary 60).

Cary 60 имеет всего две движущиеся части и долгоживущую ксеноновую лампу, что минимизирует стоимость обслуживания и последующие затраты на эксплуатацию. Спектрофотометр работает под управлением программного обеспечения Cary Win UV. Программный пакет имеет модульную структуру, что позволяет пользователю комплектовать прибор необходимыми программными модулями для различных приложений от промышленного контроля качества, связанного со сканированием по длинам волн и измерением концентраций, до научных исследований с измерением кинетических зависимостей и необходимостью термического контроля.

2) Весы лабораторные аналитические (ACCULAB).

Весы изготовлены с учетом последних достижений в области весостроения и обеспечивают высокие метрологические характеристики. Они предназначены для использования в лабораториях и на производстве в областях, где требуется высокая точность взвешивания. Особенности весов: надежная и прочная конструкция, быстрое время отклика и стабильные результаты взвешивания, удобный набор прикладных программ, возможность подключения принтера или компьютера.

3) Анализатор (TA-Lab).

Анализатор вольтамперометрический TA-Lab предназначен для высокочувствительных измерений содержания токсичных примесей в питьевых, природных, сточных водах, водных растворах проб почв, пищевых продуктов, продовольственного сырья, биологических объектов и других материалов вольтамперометрическими методами. Анализатор TA-Lab ориентирован на удобство проведения измерений в рутинном анализе с

применением малого количества реактивов. Имеет четыре формы разверток поляризирующего напряжения: постоянно-токовую, ступенчатую, квадратно-волновую и дифференциально-импульсную. Может работать в простом и дифференциальном режимах. Наиболее важные технические характеристики анализатора: чувствительность $5 \cdot 10^{-11}$ А; воспроизводимость аналитических сигналов 1-5 %; продолжительность одновременного анализа трех подготовленных проб 5-30 мин.

4) Система горизонтального электрофореза (Cleaver).

Метод электрофоретического разделения фрагментов нуклеиновых кислот и белков до сих пор широко используемый в лабораторной практике. Данный метод привлекателен тем, что требует немного времени на подготовку образцов к анализу, мало восприимчив к посторонним примесям в пробе и имеет низкую себестоимость анализа. Общие технические характеристики: карманы для проб устойчиво сохраняют форму, защищены от утечек, кассетный тип электродов недорог, легкозаменяемый, антикоррозийный (платина 99,99%), электрическая безопасность обеспечена невозможностью перепутать полярность электродов, и автоотключением буферной ячейки при открывании.

5) Микроскоп электронный просвечивающий JEM-2100F.

Электронный микроскоп JEM-2100, являющийся последней моделью 200 кВ-микроскопов фирмы JEOL, сочетает высокие электронно-оптические параметры, разнообразные методические возможности получения и вывода информации, эффективность и удобство работы. Микроскоп оборудован LaB₆ катодом повышенной яркости, цифровым сканирующим устройством, устройством изменения угла сходимости электронного пучка для выполнения исследований методом сходящегося пучка, гониометром с пьезоконтролем положения объекта на атомном уровне. Конструкция микроскопа обладает повышенной виброустойчивостью. Вывод изображений осуществляется как на флуоресцентный экран, так и на монитор с помощью CCD камеры высокого разрешения и с увеличенным полем зрения.

б) Учебно- лабораторный программно-аппаратный комплекс «Химия в школе».

Концепция УЛПАК «Химия в школе» предполагает реализацию нескольких принципиальных требований. Одно из первых универсальность, где работа ведется на одном лабораторном модуле, через единообразный интуитивно понятный интерфейс. Второе это компактность т.е. совмещение в одном приборе большого числа управляющих, измерительных и вспомогательных устройств (нагревательная плитка, нагреватель пробирок, термостат, магнитная мешалка, электролизер, вольтметр, освещение рабочей зоны, штативы, более 20 измерительных датчиков).

В работе использовалась мерная лабораторная посуда: флаконы (пеницилинки) объемом на 10 мл, колбы конические с цилиндрической горловиной вместимостью 250.0 мл; пробирки вместимостью 10.0 и 15.0 мл; флаконы с винтовой крышкой вместимостью 10 мл; колбы мерные с пришлифованной стеклянной крышкой вместимостью 20.0 мл; erendorf вместимостью 2.0 мл; пипетки объемом 2.0 мл и 5.0 мл; автоматические дозаторы.

2.2 Реактивы

- Дистиллированная и деионизированная вода;
- Нитрат серебра (AgNO_3), ГОСТ 1277-75 Россия;
- Боргидрид натрия (NaBH_4), CAS 16940-66-2, Sigma-Aldrich;
- Бычий сывороточный альбумин (БСА) производитель Sigma-Aldrich, молекулярная масса ~ 66 kDa, содержание $\geq 98\%$, pH 7;
- Вакцина «Энцефир» суспензия для в/м введения; ампулы 0.5 мл; №000763/01, 14.04.2004 производитель от Микроген НПО ФГУП (НПО «Вирион», Томск) (Россия);
- Иммуноглобулин человеческий против клещевого энцефалита ампулы 1 мл; производитель от Микроген НПО ФГУП (НПО «Вирион», Томск) (Россия);

- Азотная кислота (HNO_3), ГОСТ 4461-77, Россия;
- Серная кислота (H_2SO_4), ГОСТ 4204-77, Россия;
- Хлорид калия (KCl), ГОСТ 4568-95, Россия;
- Гидроксид натрия (NaOH), ГОСТ 2263-79, Россия.

2.3 Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовались:

1. Наночастицы серебра;
2. Биоконъюгаты на основе наночастиц серебра.

2.4 Методы исследования

2.4.1 Получение наночастиц серебра

Синтетический метод [59], при соблюдении и контроля всех условий, позволяет получать стабильное коллоидное серебро. Условия включают в себя время перемешивания и концентрацию добавляемых реагентов. В эксперименте используются: нитрат серебра (>99% AgNO_3), боргидрид натрия (>99% NaBH_4), деионизированная вода .

Последовательность эксперимента:

- 1) С помощью мерного цилиндра наливали 15 мл, 0,0020 М раствор NaBH_4 , в колбу объемом 250мл, которую помещали в ледяную баню и давали остыть в течении 20 минут. Раствор боргидрида натрия должен быть приготовлен свежим.
- 2) В центр на дно колбы помещали магнитную мешалку, и начинали перемешивание.
- 3) Далее добавляли 5 мл, 0,0010 М раствор AgNO_3 по каплям. Время добавления всего раствора около 3х минут. После 2 мл, раствор приобретает светло-желтую окраску.
- 4) Останавливали перемешивание, как только весь раствор нитрата серебра был добавлен в колбу и вытаскивали магнитную мешалку. Если перемешивание продолжается, раствор темнеет и частицы оседают на дно.

Спектр поглощения полученных растворов был измерен на спектрофотометре УФ-видимой области от 200 нм до 800 нм. Полученные данные сравнивали с литературными.

2.4.2 Получение биконъюгатов на основе наночастиц серебра с БСА

Методика взаимодействия наночастиц серебра с БСА: полученные НЧ серебра (10 мкг/мл) были инкубированы с раствором БСА различной концентрацией (0,5% - 5%), при температуре 37 C⁰ в течение одного часа. Реакционный объем 2мл, содержащий 0,035мл БСА [60].

Спектр поглощения полученных растворов был измерен с использованием спектрофотометра УФ-видимой области от 200 нм до 600 нм. Наночастицы серебра покрытые БСА характеризуются максимумом поглощения при 395 нм [60].

2.4.3 Получение биконъюгатов на основе наночастиц серебра с иммуноглобулином человеческим против клещевого энцефалита

Методика взаимодействия наночастиц серебра с иммуноглобулином: полученные НЧ серебра (10 мкг/мл) доводили до рН=9 раствором NaOH (0,5 моль/дм³) далее они были инкубированы с раствором иммуноглобулина различной концентрацией (0,3% - 5%), при температуре 37 C⁰ в течение одного часа. Реакционный объем 2мл, содержащий 0,035мл иммуноглобулина [61].

Спектр поглощения полученных растворов был измерен с использованием спектрофотометра УФ-видимой области от 200 нм до 600 нм. Наночастицы серебра покрытые иммуноглобуллином характеризуются максимумом поглощения при 395 нм .

2.4.4 Методика исследования наночастиц серебра и их биконъюгатов спектрофотометрическим методом

Метод спектрофотометрии является классическим для определения наночастиц в растворе. Поскольку для наночастиц характерна высокая доля поверхностных атомов, положение и форма полосы поверхностного плазмонного резонанса сильно зависят от локальной диэлектрической проницаемости среды вблизи поверхности. Поэтому любое изменение в окружении частиц (поверхностное модифицирование, агрегация, изменение показателя преломления среды и др.) приводит к изменению их оптических свойств. Поэтому метод был взят в качестве сравнения для получения достоверной информации о наличии наночастиц серебра в растворе и формирования биконъюгатов.

Наночастицы серебра имеют ярко-желтую окраску и имеют величину максимума поглощения при длинах волн 390-400 нм [59]. Растворы наночастиц и их биконъюгатов, в диапазоне концентраций от $1,6 \cdot 10^{-4}$ до $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, помещали в кювету объемом 5 мл с длиной оптического пути 1 см. Все измерения проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60, от 200 нм до 600 нм, относительно деионизированной воды.

2.4.5 Методика исследования наночастиц серебра и их биконъюгатов оптическим методом

Метод просвечивающей электронной микроскопии используется для точного определения размера и формы образцов. В основе метода ПЭМ лежит упругое рассеяние пучка электронов при взаимодействии с исследуемым объектом. Изображение формируется потоком рассеянных электронов с энергией 50 - 200 кэВ, прошедших через находящийся на подложке образец, и при помощи системы магнитных линз проецируется на матрицу ПЗС-камеры, люминесцентный экран или фотопластинку. Для подготовки образцов с наночастицами 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 получаются 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..

2.4.6 Методика исследования электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов

Методика получения золото-ансамблевого электрода (ЗАЭ)

В ходе эксперимента собирали трехэлектродную ячейку, состоящую из рабочего углеродсодержащего и двух хлорсеребряных. Для поиска рабочих условий определения наночастиц серебра был использован углеродсодержащий электрод, который состоит из полиэтиленового корпуса, который заполнен электропроводящей смесью полиэтилена с техническим углеродом, и является твердым композитным электродом. Путем модифицирования поверхности электрода получают микроэлектродные ансамбли, отличающиеся высокими чувствительностью и стабильностью работы. Регенерация рабочей поверхности электрода осуществляется путем срезания тонкого слоя (0,1-0,3мм) специальным резакром. Перед работой электрод протирали фильтровальной бумагой и промывали деионизированной водой. Рабочий диапазон потенциалов от минус 2 до 2 В. В качестве электрода сравнения в работе использовали хлоридсеребряный электрод (ХСЭ). ХСЭ представлял собой полый цилиндр, заполненный раствором хлорида калия, в который опущена серебряная проволочка, покрытая труднорастворимой солью хлорида серебра. Готовый ХСЭ хранили в насыщенном растворе KCl и перед работой ополаскивали деионизированной водой. Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору TA-Lab.

Методика иммобилизации антигена против клещевого энцефалита на поверхности ЗАЭ

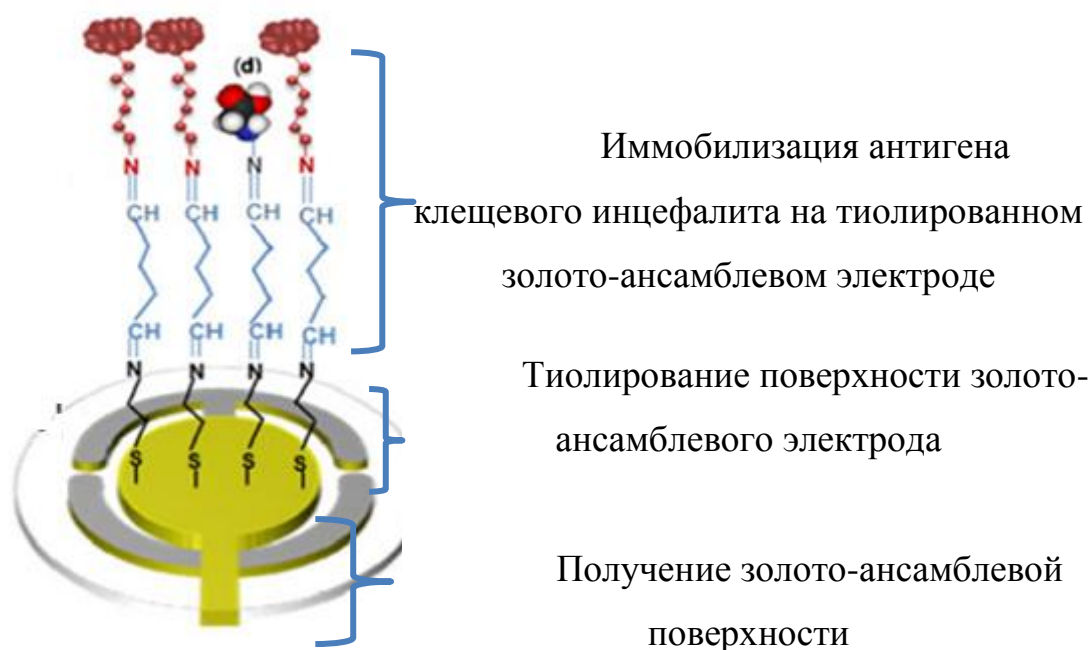


Рисунок 2.1 - Многоэтапность процедуры модификации электрохимического иммуносенсора

1) Получение золото-ансамблевой поверхности, где золото наносилось путем электролиза из HAuCl_4 (1000мг/дм^3), по методике: $W = 5$ [мВ/с], $t_{\text{э}}=30\text{с}$, $E_{\text{усп.}}$ и $E_{\text{раств.}} = 0,5\text{В}$.

2) Тиолирование поверхности золото-ансамблевого электрода по методике: вымачивание электрода в растворе глутатиона ($C = 5 \cdot 10^{-2}$ моль/ дм^3 , $t=3$ часа).

3) Иммобилизация антигена клещевого энцефалита на тиолированном золото-ансамблевом электроде, включающая несколько стадий [62]:

- инкубирование в глутаровом альдегиде (2,5%) в течение 45ти минут, при комнатной температуре. После 3 раза промыть фосфатным буфером (рН=7,4);

- следующий этап иммобилизация антигена на поверхности электрода. Время инкубирования 3 часа, при температуре 37C^0 , концентрация антигена 3мкг/мл ,

- после блокировка сайтов неспецифического связывания в растворе глицина ($5 \cdot 10^{-2}$ моль/ дм^3) в течение двух часов.

Полученные электроды с иммобилизованным антигеном на поверхности хранить при температуре 4C^0 .

4) Последним этапом сборки «сэндвич системы» является инкубирование электрода, с иммобилизованным антигеном на поверхности, в растворе биконъюгата на основе антител против клещевого энцефалита с наночастицами серебра. Время инкубирования 3 часа при температуре 37C^0 .

На каждом этапе модификации были изучены электрохимические свойства наночастиц серебра и их биоконъюгатов.

Методика исследования электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов.

Общий объем электрохимической ячейки составлял $7,7\text{ см}^3$ раствора фонового электролита. Фонового электролита готовился путём смешения 7мл азотной кислоты (0,1М) с 0,7мл хлоридом калия (0,01М). Для работы собирали двухэлектродную ячейку, состоящую из рабочего углеродсодержащего и хлорсеребряный использовался в качестве электрода сравнения.

Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору TA-Lab. Использовался постоянноточковый режим катодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала составляла $W=100\text{мВ/с}$, рабочий диапазон потенциалов от 0,8 до минус 0,2 В. Перемешивали раствор

с помощью вибрации электродов 10 секунд. Потенциал накопления минус 0,8В, время накопления 60 секунд. Осуществляли успокоение раствора в течении 5ти секунд. Далее снимали вольтамперограмму фонового электролита в указанной области потенциалов. Повторяли съемку вольтамперограммы не менее 3-5 раз.

Методика получения сигнала от биоконъюгата (наночастицы серебра с антителами против клещевого энцефалита) связанном с антигеном против клещевого энцефалита.

Электрохимический иммуносенсор, на поверхности которого образован комплекс антиген-антитело, предварительно растворяли в 1мл концентрированной азотной кислоты в течении 15 минут. Раствор доводили до объема 6,7 мл, где концентрация хлорид ионов составила $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³, регистрацию сигнала ввели на другом электроде. Для работы собирали двухэлектродную ячейку, состоящую из рабочего ЗАЭ и хлорсеребрянного, который использовался в качестве электрода сравнения. Вольтамперограмму снимали в области потенциалов от 0,8В до минус 0,2В. В качестве холостого использовали опыт без иммобилизованного на поверхности электорда антигена. Потенциал накопления минус 0,8В, время накопления 60 секунд.

2.4.7 Методика определения общего заряда молекул методом электрофореза

Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода. Исследование проводилось методом горизонтального гель-электрофореза,

где концентрация агарозы в геле 0,7%. Рабочий буфер Трис-ацетатный буфер (ТАЕ).

Ход работы:

1) В термостойкую колбу добавили 0,35г агарозы и 50 мл 1x ТАЕ. Колбу поставили в микроволновую печь на 1,5 минуты при максимальной мощности, после остывания до 70 С⁰ гель залили в кювету и поместили гребенку.

2) После завершения полимеризации, гребенку вытащили. Гель поместили в камеру для электрофореза, которую заполнили 1x ТАЕ буфером.

3) К образцам объемом 15мкл добавили 1мкл буфера для внесения образцов

4) Внесли образцы и маркер в карманы геля

Электрофорез проводили при 70 В в течение 30 минут

Глава 3 Результаты исследования

3.1 Характеристика полученных наночастиц серебра

В литературе приводится множество оригинальных методик получения наночастиц серебра, среди них. В работе НЧ серебра синтезировали химическим восстановлением из AgNO_3 в растворе боргидрида натрия, при этом, хотелось бы отметить, что варьирование условий синтеза (восстановитель, соотношение концентраций) оказывает существенное влияние на стабильность и размер наночастиц. При соблюдении условий эксперимента (контроль температуры, использование магнитной мешалки) этот метод позволяет получить частицы размером $12 \pm 2 \text{ нм}$, с четко выраженной полосой поглощения наночастиц серебра при $\lambda = 390\text{-}400 \text{ нм}$ [59] (методика получения представлена в разделе 2.4.1). В настоящей работе исследованы наночастицы серебра спектрофотометрическим методом (методика представлена в разделе 2.4.4). Согласно литературным данным [59] НЧ-цы серебра имеют характерный пик при длине волны 390-400 нм, спектры поглощения полученных наночастиц представлены на рисунке 3.1.

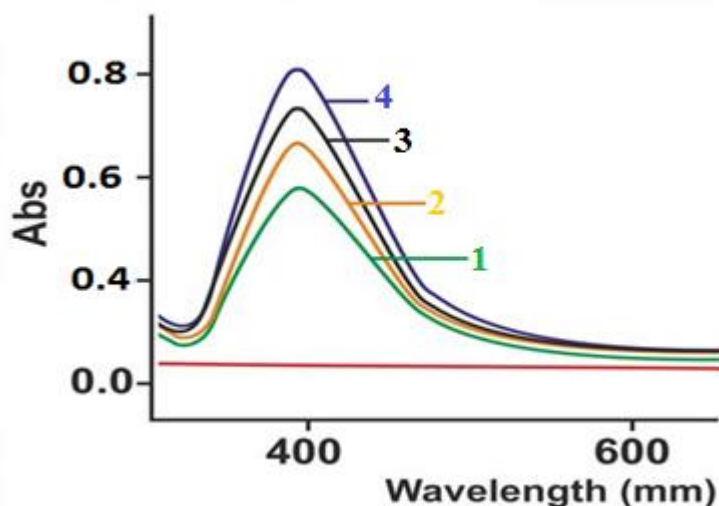


Рисунок 3.1 – Зависимость поглощения наночастиц от их концентрации в растворе

1 – $C_M(\text{НЧ Ag}) = 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, 2 – $C_M(\text{НЧ Ag}) = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ М}$,
3 – $C_M(\text{НЧ Ag}) = 2,2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, 4 – $C_M(\text{НЧ Ag}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$

Как видно из рисунка 3.1 Полученные наночастицы имеют характерный пик при $\lambda_{\max}=395$ нм, что совпадает с литературными данными. С уменьшением концентрации наночастиц в растворе величина максимума поглощения уменьшается, что свидетельствует о наличии НЧ серебра в растворе. Все измерения оптической плотности проводили относительно деионизированной воды.

Размер и форма полученных НЧ был определен методом просвечивающей электронной микроскопии (методика представлена в разделе 2.4.5). Результаты анализа представлены на рисунках 3.2 и 3.3.

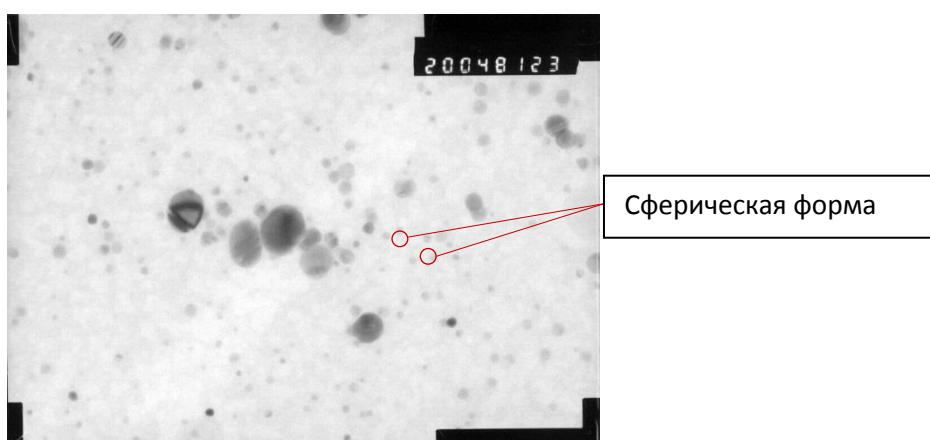


Рисунок 3.2 - Просвечивающая электронная микроскопия НЧ серебра.

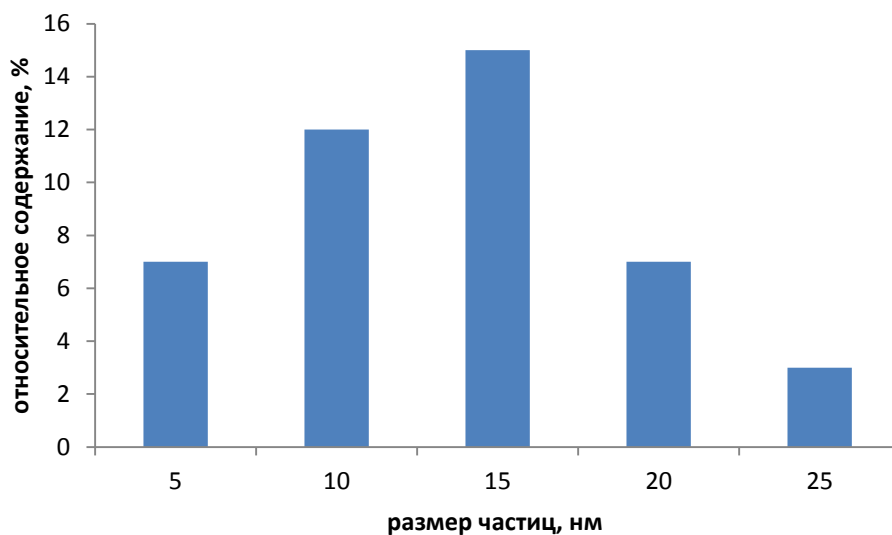


Рисунок 3.3 - Гистограмма распределения наночастиц серебра по размеру

Согласно данным представленным на рисунках 3.2 и 3.3 полученные наночастицы серебра имеют сферическую форму, со средним размером

частиц 15 нм. Стабильность наночастиц напрямую зависит от соотношения концентраций $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$. Зависимость стабильности частиц от соотношения $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1- Зависимость стабильности частиц от соотношения $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$

$[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$	Время разрушения коллоида
2/1	стабильный (месяц)
2.1/1	30 минут
1.8/1	5 минут

Таким образом были получены наночастицы серебра сферической формы, со средним размером 15 нм, которые были использованы для получения биконъюгатов на основе ВСА и антител клещевого энцефалита.

3.2 Характеристика биконъюгатов на основе наночастиц серебра

3.2.1 Характеристика биконъюгата на основе наночастиц серебра с БСА

Сыворотка альбумина представлена наиболее широко в объеме плазмы крови, где одиночная полипептидная цепь состоит из 583 аминокислотных остатков. Некоторые остатки в БСА содержат серо-, кислород-, и азотсодержащие группы, которые могут стабилизировать поверхность наночастиц. Белковые молекулы бычьего сывороточного альбумина были синтезированы в водном растворе, концентрацией 0,5% - 5% [60].

Следующим этапом работы было получение биконъюгата на основе модельного белка бычьего сывороточного альбумина с наночастицами серебра (методика получения представлена в разделе 2.4.2). Спектр поглощения полученных биконъюгатов представлен на рисунке 3.4.

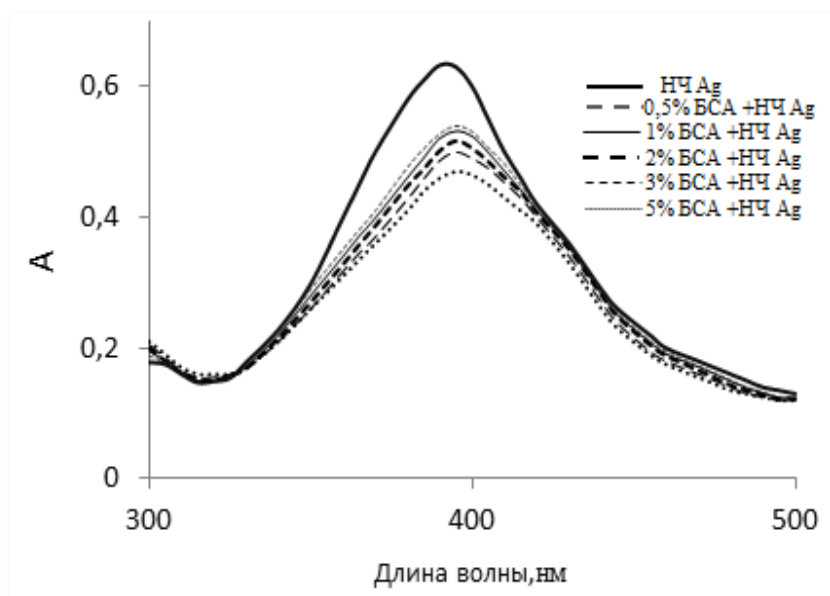


Рисунок 3.4 - Спектры поглощения взаимодействия наночастиц серебра (10мкг/мл) с БСА

Из рисунка 3.4 видно, что полоса поглощения смещается в длинноволновую область и изменяется величина максимума поглощения в зависимости от введённой концентрации БСА, что говорит о взаимодействии наночастиц серебра с БСА. Известно, что БСА участвует в стабилизации наночастиц серебра [60], соответственно это приводит к их укрупнению.

Полученные биконъюгаты были исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии, что представлено на рисунке 3.5, где видно укрупнение НЧ и участие белка в виде полупрозрачной шубки. Гистограмма распределения по размеру биконъюгата на основе БСА представлена на рисунке 3.6.

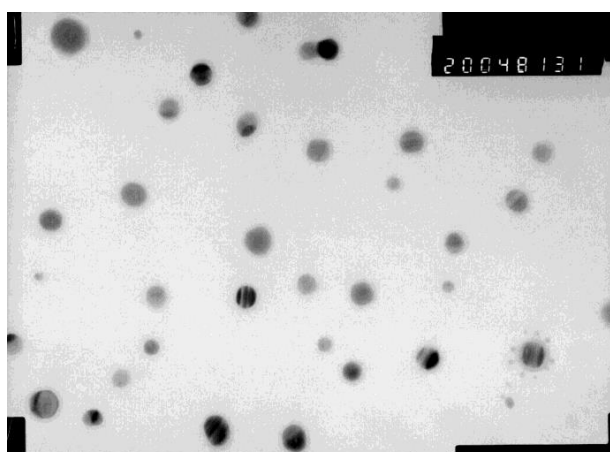


Рисунок 3.5 - Просвечивающая электронная микроскопия НЧ
серебра+БСА

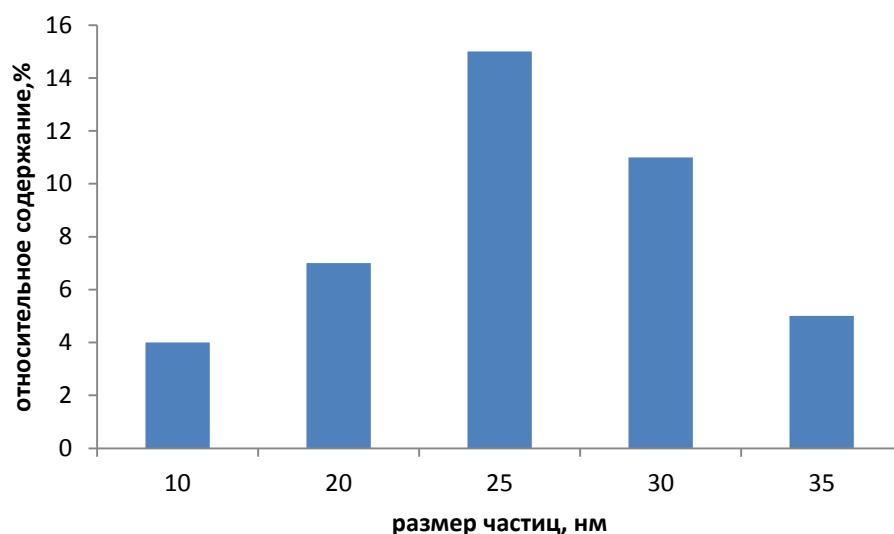


Рисунок 3.6 - Гистограмма распределения по размеру биоконъюгата
на основе БСА

Таким образом, белковые молекулы стабилизируют наночастицы серебра, средний размер биоконъюгатов на основе БСА составляет 25 нм.

3.2.2 Характеристика биоконъюгатов на основе наночастиц серебра с иммуноглобулином человеческим против клещевого энцефалита

Для апробации биоконъюгатов наночастиц серебра в тест-системе необходимо подобрать биологическую пару, функционирующую по принципу антиген-антитело. Было предложено получить биоконъюгат наночастиц серебра на основе антител против клещевого энцефалита (Иммуноглобулин противоклещевой).

Иммуноглобулин противоклещевой имеет в составе активную фракцию белка, которую выделяют из сыворотки или плазмы. В ней содержатся антитела специфические к вирусу клещевого энцефалита. Чтобы получить белок, применяется плазма, полученная из крови здоровых

доноров, прошедших проверку на отсутствие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ. В качестве стабилизатора используется глицин (аминоуксусная кислота) [63].

В работе были получены биконъюгаты на основе наночастиц серебра с человеческим иммуноглобулином против клещевого энцефалита (методика получения представлена в разделе 2.4.3). Спектры поглощения наночастиц серебра и его биконъюгатов представлены на рисунке 3.7, где видно смещение полосы поглощения в длинноволновую область, а так же изменение величины максимума поглощения от введенной концентрации иммуноглобулина в раствор, что говорит о взаимодействии наночастиц серебра с иммуноглобулином.

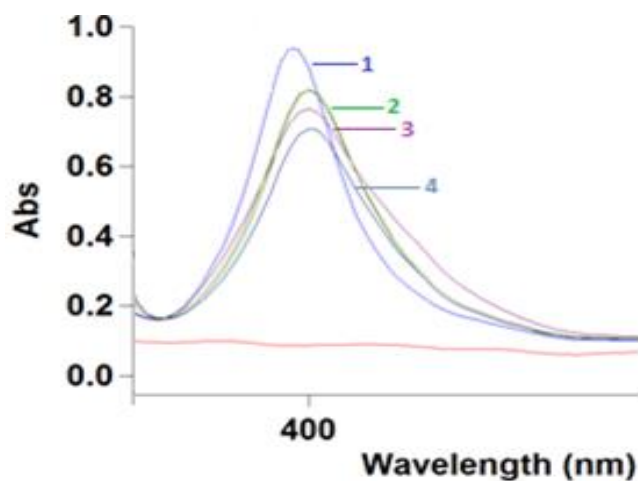


Рисунок 3.7 - Спектр поглощения наночастиц серебра с иммуноглобулином

- 1- наночастицы серебра ($C = 10$ мкг/мл); 2 - биконъюгат С (НЧ Ag) = 10 мкг/мл + 0,5% иммуноглобулин; 3 - биконъюгат С (НЧ Ag) = 10 мкг/мл + 3 % иммуноглобулин; 4 - биконъюгат С (НЧ Ag) = 10 мкг/мл + 5% иммуноглобулин

3.3 Определение электрического заряда полученных биконъюгатов

В литературе [64] описано три механизма взаимодействия НЧ металлов с белками (рис. 3.8): первый основан на электростатическом взаимодействии, второй за счет гидрофобного взаимодействия, третий за счет ковалентного сшивания. В нашем случае предположителен механизм

гидрофобного взаимодействия. Для доказательства механизма был проведен горизонтальный гель электрофорез, для определения общего заряда молекул (методика представлена в разделе 2.4.7). Исходя из литературных данных [59], НЧ окружены отрицательной боргидридной оболочкой имеют общий отрицательный заряд, что подтверждено методом горизонтального гель-электрофореза (рис.3.9). Кроме того на рисунке 3.9 видно, что и биконъюгаты на основе БСА и иммуноглобулина, продвинулись относительно линии старта к аноду, что говорит о наличии общего отрицательного заряда молекул.

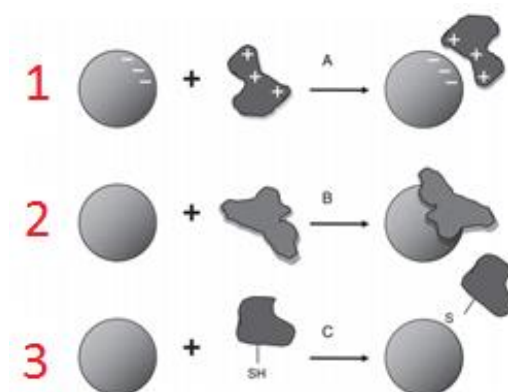


Рисунок 3.8 - Различные типы взаимодействия белков и металлических наночастиц 1- электростатическое взаимодействие; 2- гидрофобное взаимодействие; 3- за счет ковалентного сшивания

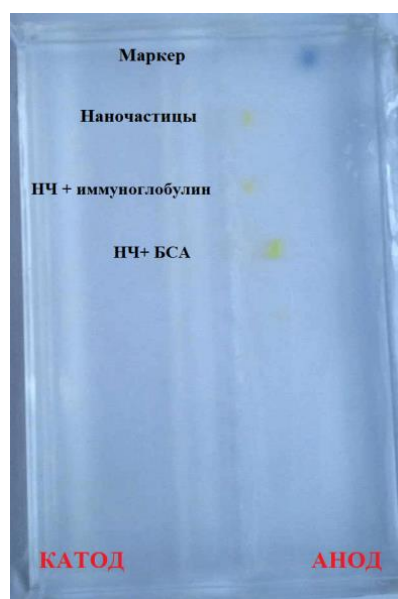


Рисунок 3.9 - Горизонтальный гель электрофорез для определения электрического заряда молекул

Согласно данным горизонтального геля электрофореза, заряд наночастиц серебра и их биоконъюгатов - отрицательный, что подтверждает предположение, что биокомплексы формируются за счет гидрофобного связывания.

3.4 Разработка электрохимического иммуносенсора сенсора на основе биоконъюгатов наночастиц серебра

Одной из главных задач работы являлась возможность использования полученных биоконъюгатов наночастиц серебра для разработки электрохимического иммуносенсора, работающего по типу аффинного связывания (антиген-антитело) в «сэндвич системе». В работе для разработки электрохимического иммуносенсора использовался белковый препарат антигена клещевого энцефалита (производитель НПО «Микроген», Россия, Томск) иммобилизованный на тиолированной поверхности золото-ансамблевого электрода по методике представленной в разделе 2.4.6.

Разработка электрохимического иммуносенсора являлась сложной многостадийной задачей, которая состояла из получения биоактивного слоя антигена клещевого энцефалита на золото-ансамблевом электроде и изучения электрохимических свойств полученных наночастиц серебра и их биоконъюгатов на основе ВСА и иммуноглобулинов клещевого энцефалита на всех этапах формирования «сэндвич системы».

3.4.1 Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов на золото-ансамблевом электроде

Первым этапом были исследованы электрохимические свойства наночастиц серебра на золото-ансамблевом электроде (ЗАЭ). Получение золото-ансамблевого электрода проводилась по методике представленной в разделе 2.4.6.

На рисунке 3.10 представлена циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления НЧ серебра в присутствии хлорид ионов на золото-ансамблевом электроде от концентрации введённых в электрохимическую ячейку НЧ серебра.

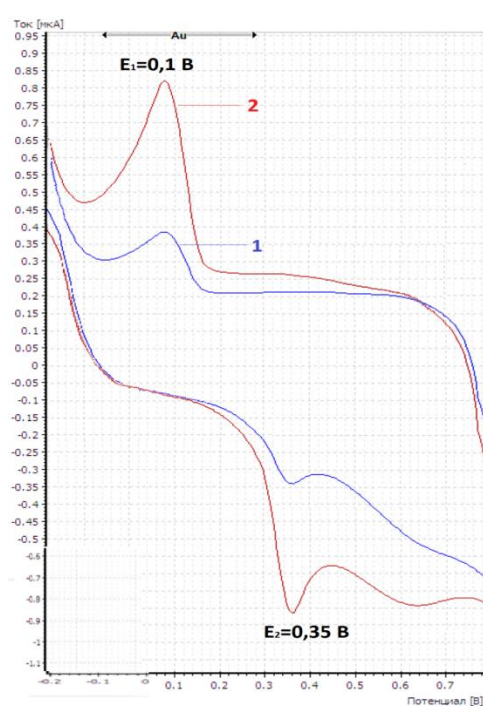
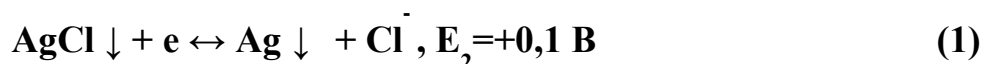


Рисунок 3.10 - Циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления НЧ серебра на золото-ансамблевом электроде

$W=100$ мВ/с, $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,8\text{В}$, $t_{\text{э}}=60\text{с}$; фон: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ КСl + 0,1 М HNO₃)
 1 - НЧ Ag ($6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³); 2 - НЧ Ag ($13,2 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³)

Согласно данным рис. 3.10 в катодной области наблюдался сигнал восстановления-окисления хлорида серебра при потенциалах $E_{\text{к}}=0,1\text{В}$, $E_{\text{а}}=0,35\text{В}$.

по уравнению электродного процесса:



Т.к. фоновым электролитом являлся раствор 0.1М HNO₃ в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ КСl то необходимо отметить, что при введении наночастиц серебра происходит их деградация до свободной ионной формы серебра с последующим формированием AgCl на поверхности золото-

ансамблевого электрода. Подтверждением деградации НЧ серебра в фоновом электролите является спектрофотометрическое исследование наночастиц серебра в отсутствии и присутствии хлорид ионов в кислой среде HNO_3 (ри.3.11).

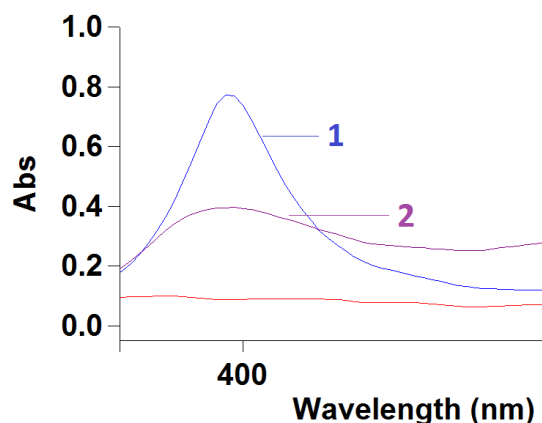


Рисунок 3.11 - 1-Спектр поглощения наночастиц серебра 10мкг/мл в деионизированной воде 2- Спектр поглощения наночастиц серебра 10мкг/мл в 0,1 М калий хлориде

Согласно данным рисунка 3.11 видно, что при добавлении калия хлорида в систему величина максимума поглощения при длине волны 395 нм уменьшается, что связано с деградацией НЧ в выбранной среде с формированием ионной формы серебра Ag^+ .

В дальнейших исследованиях для определения НЧ серебра была выбрана катодная область в диапазоне потенциалов от 0,8В до минус 0,2В. На рис. 3.12 представлена вольтамперограмма восстановления AgCl при разном времени электролиза.

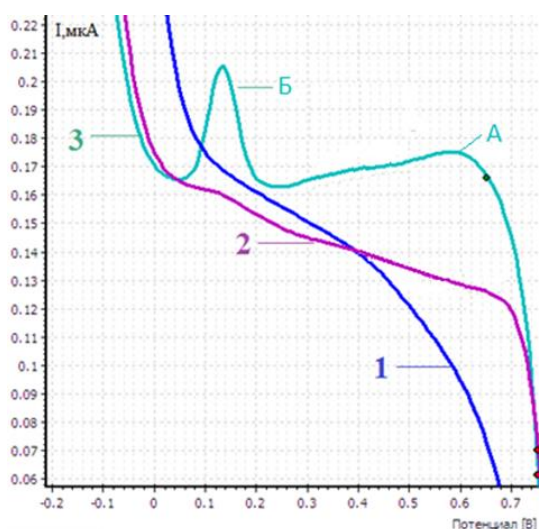


Рисунок 3.12 Вольтамперограмма восстановления AgCl

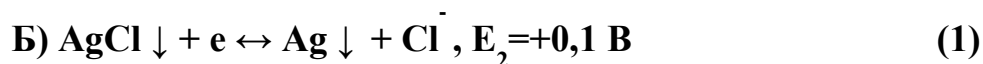
$$W=100 \text{ мВ/с}, E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,8\text{В}, t\tau=60\text{с}$$

1 – фон: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + 0,1 М HNO₃);

2 – НЧ серебра ($6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $t\tau=11$ мин;

3 – НЧ серебра ($6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $t\tau=22$ мин.

Необходимо отметить, что кроме восстановления AgCl, наблюдается сигнал при потенциале $E=0,6\text{В}$. Электродные механизмы представлены уравнениями (1)-(2):



Катодный сигнал при потенциале $+0,6\text{В}$ соответствует электродному процессу восстановления ионов серебра. Однако сигнал восстановления ионов серебра при потенциале $+0,6\text{В}$ плохо воспроизводился и все дальнейшие исследования по количественному определению НЧ серебра и их биоконъюгатов в электрохимической ячейке проводились с использованием данного сигнала восстановления AgCl при $E_2 = +0,1 \text{ В}$.

Определение рабочих условий электрохимического определения наночастиц серебра

В связи с тем, что электрохимический сигнал от деградированных НЧ серебра связан с накоплением AgCl на золото-ансамблевом электроде, необходимым этапом по определению рабочих условий являлся этап подбора параметров потенциала ($E_{\text{нак.}}$), времени накопления ($t_{\text{нак.}}$), концентрации KCl и pH среды в условиях катодной вольтамперометрии.

Определение рабочих условий электрохимического поведения AgCl проводилось при варьировании нескольких параметров в области потенциалов от 0,8 В до минус 0,2 В в соответствии с методикой описанной выше. На рисунке 3.13 показана Зависимость тока восстановления AgCl от потенциала накопления. Выяснилось, что при потенциале накопления минус 0,8 В был получен максимальный сигнал при потенциале 0,1В.

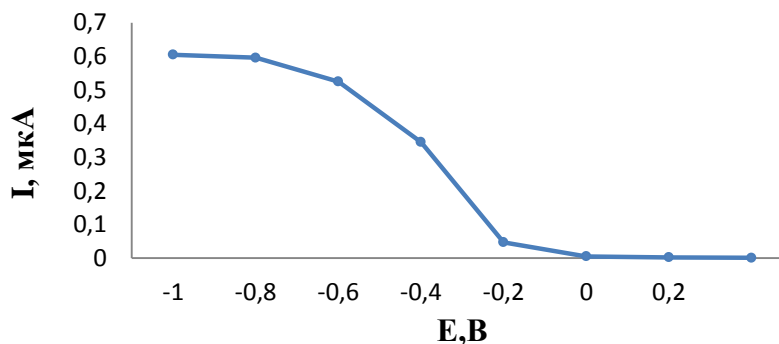


Рисунок 3.13 - Зависимость тока восстановления AgCl ($C=6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/ дм^3) от потенциала накопления. $W= 100$ мВ/с

Дальнейшим этапом было исследование влияния времени накопления на аналитический сигнал при выбранном потенциале накопления минус 0,8В, оптимальное время составляет 60 секунд (рисунок 3.14).

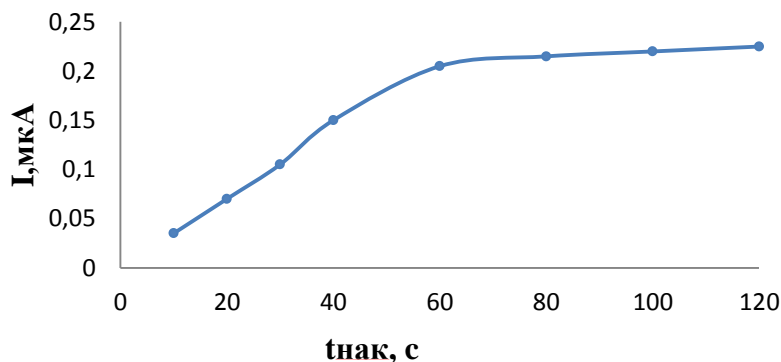


Рисунок 3.14 - Зависимость тока восстановления AgCl ($C=6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) при постоянном потенциале накопления $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,8\text{В}$ от времени накопления. $W= 100$ мВ/с

Очень важным параметром для работы с сигналом при потенциале 0,1В был подбор концентраций хлорид ионов. В таблице 3.2 представлены данные влияния концентрации хлорид ионов на время электролиза, где наиболее подходящей для работы является концентрация $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Таблица 3.2 - Влияние концентрации хлорид ионов

Концентрация КСl, моль\л	tэ, мин	Появление сигнала	I,мкА
$1 \cdot 10^{-2}$	1,5	+	0,151
$1 \cdot 10^{-3}$	8	+	0,148
$1 \cdot 10^{-4}$	14	+	0,143
$1 \cdot 10^{-5}$	15	+	0,283
$1 \cdot 10^{-6}$	24	+	0,36
$1 \cdot 10^{-7}$	37	+	0,33

Так же на рисунке 3.15, представлена катодная вольтамперограмма AgCl в отсутствии и в присутствии HNO₃ (0,1 М).

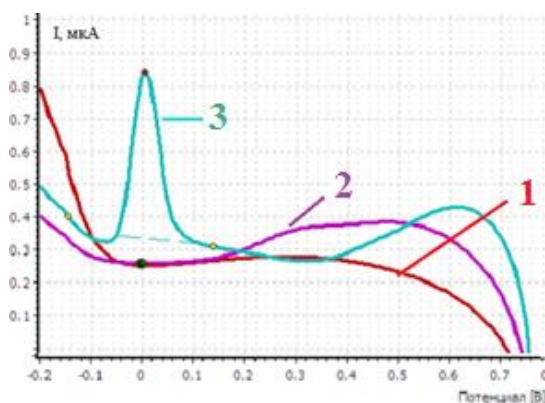


Рисунок 3.15 - Вольтамперограмма влияния кислой среды,

$W=100$ мВ/с, $E_{\text{нак}} = \text{минус } 0,8\text{В}$; Фон: деионизированная вода;

2) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + С (НЧ Ag) - $6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³;

3) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + С (НЧ Ag) - $6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³ + **HNO₃ (0,1 М)**

Согласно данным рис. 3.15 очевидно влияние кислой среды на деградацию НЧ серебра и формированию AgCl на поверхности электрода с последующим восстановлением по электродному механизму (1).

Таким образом рабочими условиями определения НЧ серебра через их деградацию в кислой среде и получению катодного сигнала от AgCl являются: фоновый электролит - HNO₃ 0,1М; концентрация хлорид ионов в ячейке - $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³; скорость развертки - $W=100$ мВ/с; потенциал накопления - минус 0,8 В; время накопления - $t_{\text{нак}}=60$ с. Данные условия приняты для определения, как наночастиц серебра, так и биконъюгатов в электрохимической ячейке.

Исследование электрохимических свойств биконъюгатов НЧ серебра на основе БСА и антител против клещевого энцефалита на ЗАЭ

При подобранных рабочих условиях далее были исследованы электрохимические свойства биконъюгатов НЧ серебра на основе БСА и антител против клещевого энцефалита на ЗАЭ.

На рисунке 3.16 показаны вольтамперограммы восстановления AgCl от НЧ серебра и их биконъюгатов на основе БСА и антител против клещевого энцефалита.

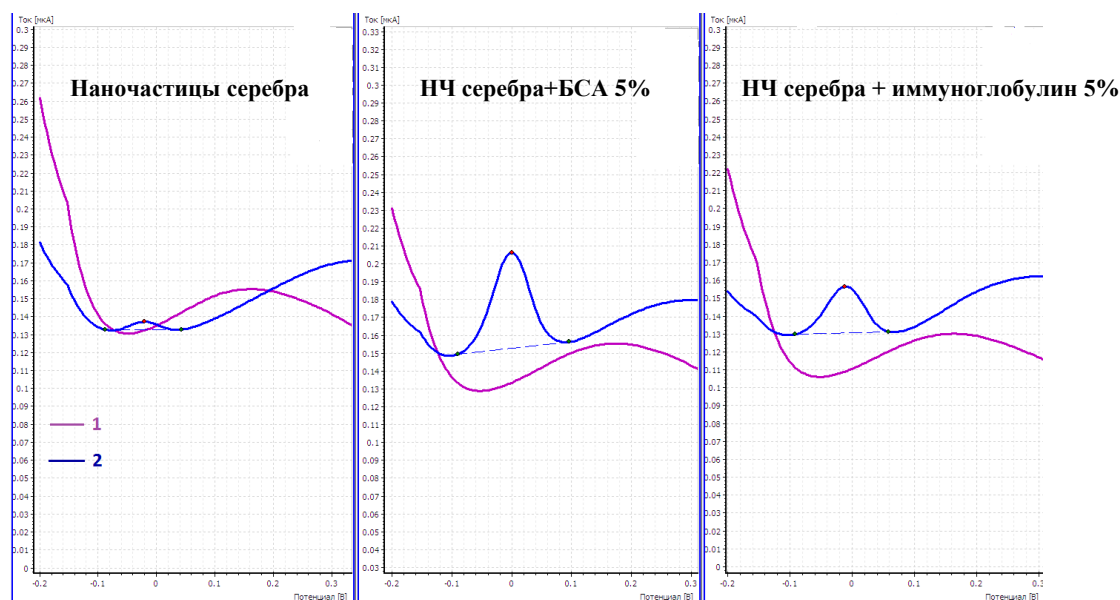


Рисунок 3.16 - Вольтамперограммы восстановления AgCl от наночастиц серебра и их биоконъюгатов, $W=100$ мВ/с, $E_{нак}=-0,8$ В

На рис. 3.16 видно, что проявление сигнала от AgCl при введении биоконъюгатов в электрохимическую ячейку происходит гораздо раньше, в сравнении с НЧ без белка. Далее сигнал от AgCl в ячейке с наночастицами стабилизируется относительно введенных биоконъюгатов, что объясняется блокировкой поверхности электрода, за счет адсорбции белка.

Полученные пики восстановления AgCl при введении биоконъюгатов на основе БСА и антител против клещевого энцефалита можно использовать в качестве аналитических сигналов при разработке электрохимического иммуносенсора связанных с определением концентраций методом вольтамперометрии. Вольтамперограммы восстановления AgCl от концентрации введенных в ячейку НЧ серебра и их биоконъюгатов представлены на рисунках: 3.17,3.18,3.19.

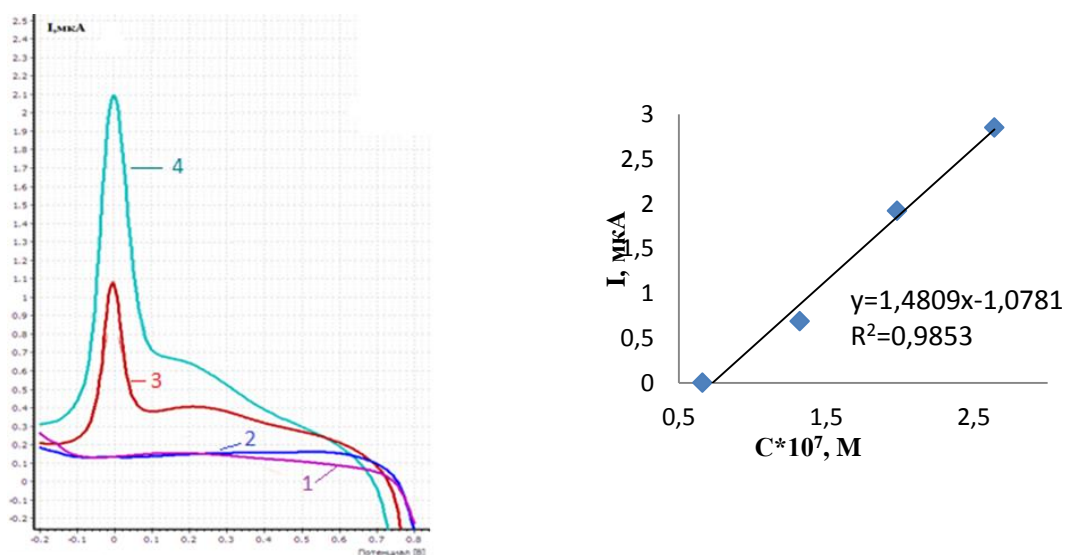


Рисунок 3.17 - Катодная вольтамперограмма AgCl от концентрации НЧ серебра в растворе, $W=100$ мВ/с, $E_{нак} = \text{минус } 0,8$ В

1 – фон: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + 0,1 М HNO₃); 2 - НЧ серебра ($6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³); 3 –НЧ серебра ($13,2 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³); 4 – НЧ серебра ($19 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³).

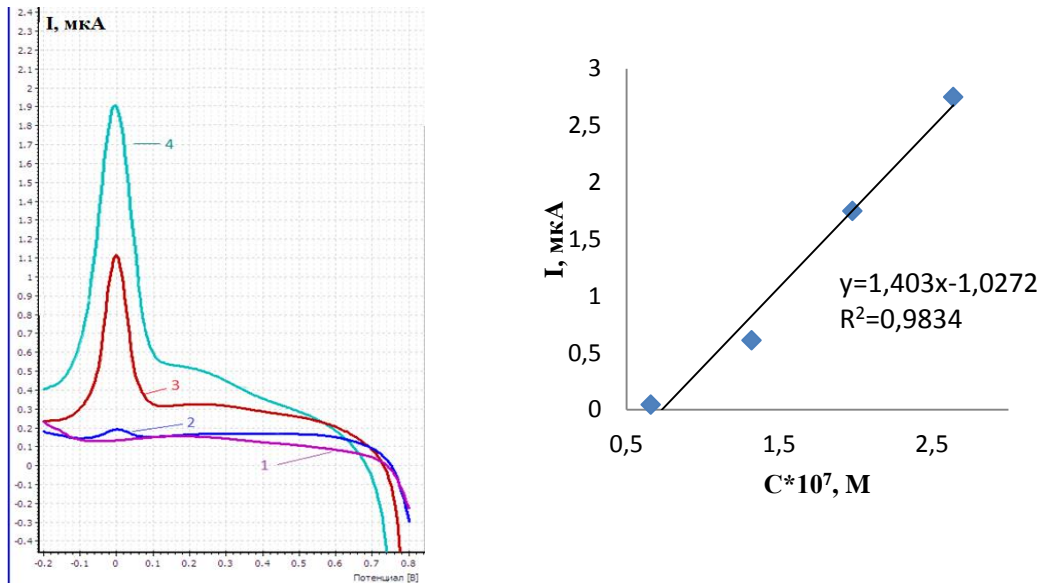


Рисунок 3.18 - Катодная вольтамперограмма AgCl от концентрации «НЧ серебра + БСА» в растворе, W=100 мВ/с, E_{нак}= минус 0,8В

1 – фон: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + 0,1 М HNO₃); 2 - НЧ серебра ($6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $1,5 \cdot 10^{-4}$ %БСА; 3 –НЧ серебра ($13,2 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $3,0 \cdot 10^{-4}$ %БСА; 4 – НЧ серебра ($19 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $4,5 \cdot 10^{-4}$ %БСА.

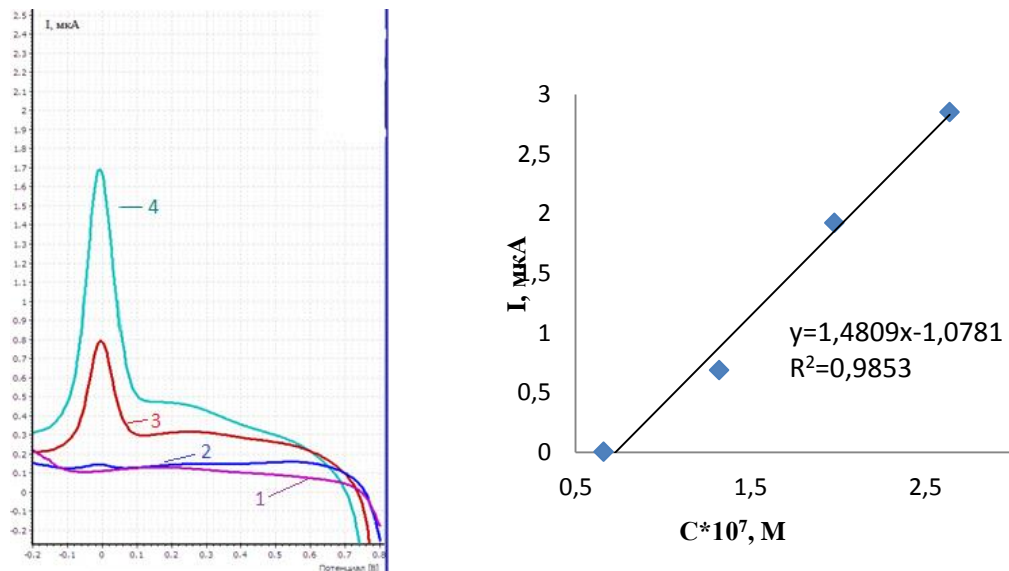


Рисунок 3.19 - Катодная вольтамперограмма AgCl от концентрации от «НЧ серебра +иммуноглобулин» в растворе, W=100 мВ/с,

E_{нак}= минус 0,8В; 1 – фон: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + 0,1 М HNO₃); 2 - НЧ серебра ($6,6 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $1,5 \cdot 10^{-4}$ %иммуноглобулин ; 3 –НЧ серебра ($13,2 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) +

$3,0 \cdot 10^{-4}$ % иммуноглобулин; 4 – НЧ серебра ($19 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) + $4,5 \cdot 10^{-4}$ % иммуноглобулин.

Согласно данным рис. 3.17, 3.18, 3.19 линейная зависимость тока восстановления AgCl от введенных НЧ серебра и их биоконъюгатов наблюдалась в диапазоне концентраций от $6,6 \cdot 10^{-8}$ до $26,4 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³. Данные условия могут быть учтены при разработке электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител против клещевого энцефалита в биологических объектах.

3.4.2 Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра и их биоконъюгатов на тиолированных ЗАЭ

Далее были исследованы электрохимические свойства биоконъюгатов на основе НЧ серебра и их биоконъюгатов на тиолированных поверхностях ЗАЭ. Методика тиолирования ЗАЭ описана в разделе 2.4.6 данной диссертации.

На рис. 3.20 представлены вольтамперограммы восстановления AgCl от НЧ серебра и их биоконъюгатов на основе БСА и антител против клещевого энцефалита на тиолированных глутатионом ЗАЭ.

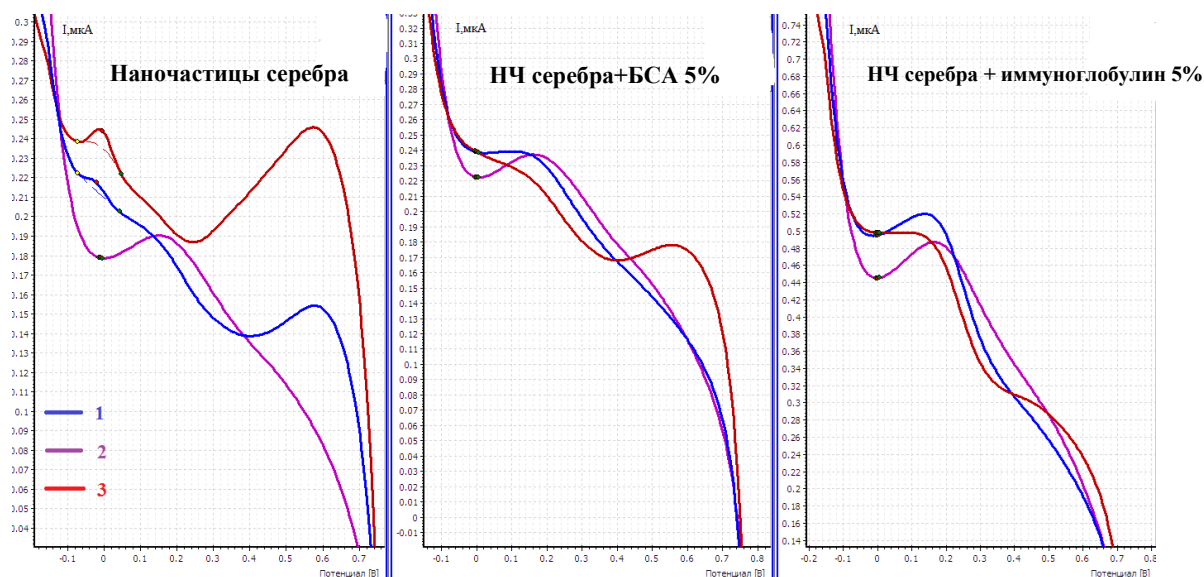


Рисунок 3.20 - Катодные вольтамперограммы AgCl от наночастиц серебра и их биоконъюгатов, $W=100$ мВ/с, $E_{нак} = \text{минус } 0,8\text{В}$ на тиолированной поверхности

На данных вольтамперограммах видно, что сигналы от биоконъюгатов практически не проявляются на первоначальном этапе, но от НЧ мы видим обратную картину. Вероятно, это связано с пассивацией поверхности ЗАЭ глутатионом, который препятствует накоплению AgCl и получением сигнала восстановления при +0.1В. Кроме того, необходимо отметить, что биоконъюгаты НЧ серебра так же стабилизированы белком, что препятствует подходу AgCl к поверхности электрода. Очевидно, НЧ серебра имеют маленький размер (10-15нм) и возможность подхода к электроду облегчена по сравнению с их биоконъюгатами, размер которых согласно данным ПЭМ около 25 нм.

Данные условия могут быть использованы для дальнейшей разработки электрохимического иммуносенсора. Стоит отметить отсутствие электрохимической проводимости тиолированного слоя биосенсора и наличия пассивации поверхности ЗАЭ. Формирование биослоя из глутарового альдегида, белковых молекул антигена и глицина полностью пассивирует поверхность электрода.

3.4.3 Разработка тестовой конструкции электрохимического иммуносенсора на основе биоконъюгата (НЧ серебра с антителами против клещевого энцефалита)

При разработке электрохимического иммуносенсора на основе биоконъюгата НЧ серебра и антител против клещевого энцефалита работающего по типу «Сэндвич» необходимо выполнить несколько этапов .

1. Иммуобилизация антигена против клещевого энцефалита на поверхности ЗАЭ (раздел 2.4.6);
2. Получение биоконъюгата НЧ серебра на основе антител (раздел 2.4.3);
3. Подбор условий получения э/х сигнала от биоконъюгата НЧ серебра на основе антител (раздел 3.4.1).

Очевидно, что при разработке электрохимического иммуносенсора количественно возможно определить антитела против клещевого энцефалита иммобилизованных на НЧ серебра (3.17, 3.18, 3.19). Кроме того, в связи с отсутствием токопроводящей поверхности тиолированного ЗАЭ необходимо проводить предварительную стадию растворения биоконъюгата НЧ серебра связанного с антигеном иммобилизованного на поверхности иммуносенсора. Методика этой процедуры представлена в разделе 2.4.6.

Схема растворения биоконъюгата на основе антител против клещевого энцефалита связанного с антигеном, иммобилизованным на поверхности иммуносенсора, представлена на рис 3.21.

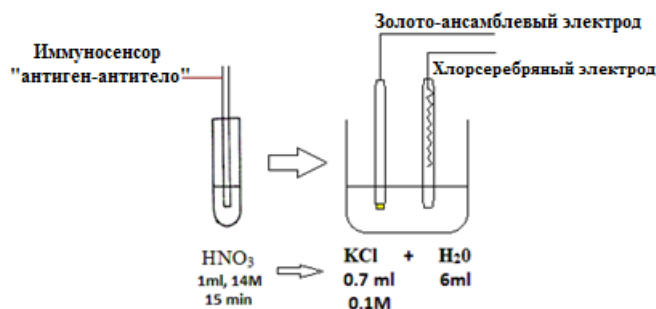


Рисунок 3.21 – Схема растворения биоконъюгата с НЧ серебра связанного с антигеном, иммобилизованного на поверхности иммуносенсора

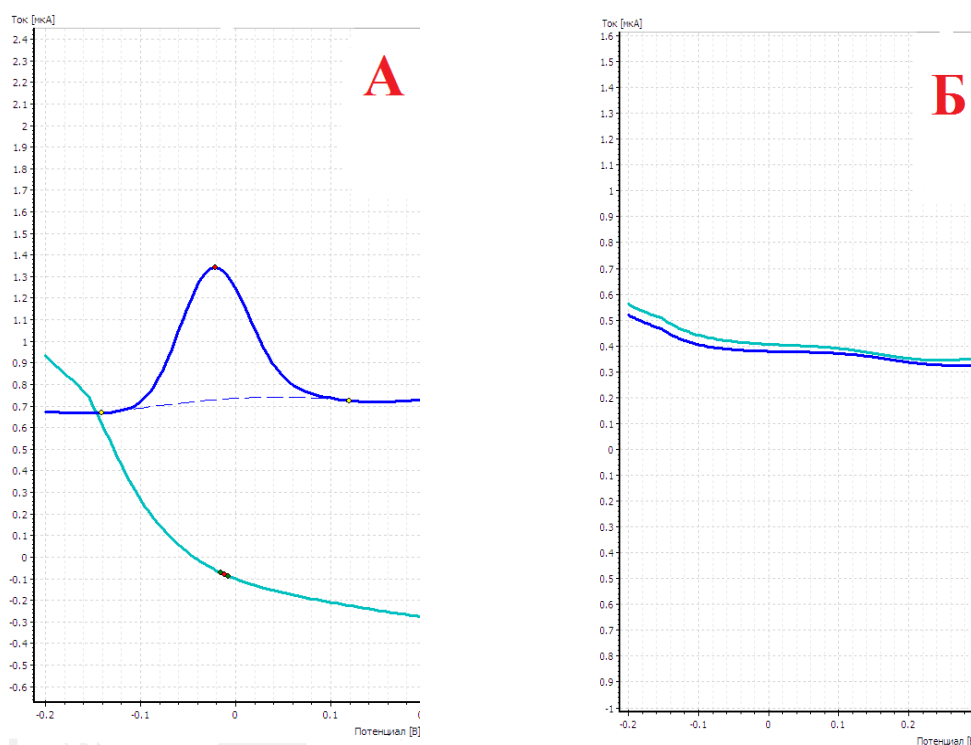


Рисунок 3.22 - Вольтамперограммы восстановления AgCl на ЗАЭ; А – Контрольный опыт с иммобилизированным антигеном на поверхности иммуносенсора; Б- холостой опыт без иммобилизованного антигена на поверхности электродов антигена.

Согласно данным рисунка 3.22 в случае А наблюдается пик восстановления соединения AgCl на поверхности ЗАЭ при потенциале 0В, а в случае Б пик при данном потенциале отсутствует. Первичное испытание тестовой конструкции электрохимического иммуносенсора показывает, что в случае А произошло связывание «антиген-антитело», а значит, антитела против клещевого энцефалита обнаружены. Электрохимический сигнал получен от НЧ серебра, которые входят в состав биоконъюгата, через образование свободной ионной формы серебра с последующим формированием AgCl на поверхности золото-ансамблевого электрода. Собранная тестовая конструкция, требует дальнейшей доработки и впоследствии возможно рекомендовать ее для проведения анализов в клинических и биохимических лабораториях.

Рекомендации по использованию экспериментальных данных для разработки электрохимического иммуносенсора и использование его при определении антител против клещевого энцефалита :

1) Получить НЧ серебра сферической формы, со средним размером 15нм, путем химического восстановления из раствора нитрата серебра, боргидридом натрия;

3) Получить биконъюгаты на основе (БСА) и на основе иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита;

4) Использовать рабочие условия определения наночастиц серебра на золото-ансамблевом электроде и принять их для определения биконъюгатов;

- Фоновый электролит: HNO_3 0,1М, концентрация хлорид ионов в ячейке: $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³;

- Скорость развертки: $W=100$ мВ/с;

- Потенциал накопления: $E_{\text{нак}}=-0,8$ В;

- Время накопления: $t_{\text{нак}}=60$ с.

5) Собрать тестовую конструкцию электрохимического иммуносенсора работающего по типу «сэндвич».

Заключение

По результатам проведенного исследования

1) Получены сферической формы наночастицы серебра со средним размером 15нм, путем химического восстановления из нитрата серебра в богидриде натрия. Получен электрохимический отклик от наночастиц серебра.

2) Получены биконъюгаты со средним размером 25 нм на основе модельного белка БСА с наночастицами серебра. Подтверждено участие БСА, как стабилизатора. Определен общий отрицательный электрический заряд биконъюгатов на основе БСА.

3) Получены биконъюгаты на основе иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита с наночастицами серебра. Показана возможность применения иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита в качестве носителя электрохимической метки при разработке электрохимического иммуносенсора.

4) Подобраны рабочие условия определения наночастиц серебра на золото-ансамблевом электроде: фоновый электролит: HNO_3 0,1М, концентрация хлорид ионов в ячейке: $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³; Скорость развертки: $W=100$ мВ/с; Потенциал накопления: $E_{\text{нак}}=-0,8$ В; Время накопления: $t_{\text{нак}}=60$ с.

5) Собрана тестовая конструкция работающая по типу «сэндвич», как альтернатива в проведении анализа на определение антител против клещевого энцефалита, иммуноферментному анализу. Подобраны рабочие условия способа иммобилизации антигена на поверхности золото-ансамблевого электрода.

Перспектива дальнейшей разработки данной темы исследования заключаются в расширении круга определяемых биологических объектов. Однако уже на данном этапе работы универсальность электрохимического иммуносенсора не вызывает сомнений, так как первичное испытание тестовой конструкции показывает, что произошло связывание «антиген-

антитело», и получен. электрохимический сигнал от НЧ серебра, которые входят в состав биоконъюгата, через образование свободной ионной формы серебра с последующим формированием AgCl на поверхности золото-ансамблевого электрода. Кроме того, планируется проведение исследований по количественному определению антител против клещевого энцефалита, с построением градуировочной зависимости. Полученные результаты уже могут стать основой для создания электрохимической тест-системы для быстрого и точного определения антител в полуавтоматическом режиме. Таким образом, разработанный электрохимический иммуносенсор может быть успешно использован в медицинских и лабораторно-диагностических сферах деятельности.

Список используемых источников

1. Quang Huy Tran, Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives / Quang Huy Tran, Van Quy Nguyen and Anh-Tuan Le // Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. - 2013. – Vol. 4, №3. – P. 20.
2. Francesco Ricci, A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors / Francesco Ricci , Gianluca Adornetto, Giuseppe Palleschi // Electrochim. Acta. - 2012. – Vol. 84. – P. 74-83.
3. Petr Skládal, Advances in electrochemical immunosensors // Electroanalysis. – 1997. - Vol. 9, №10. - P. 737-746.
4. Synthesis and applications of silver nanoparticles / Kholoud M.M., Abou El-Nour, Ala'a Eftaiha, Abdulrhman Al-Warthan, Reda A.A. Ammar // Arabian Journal of Chemistry – 2010. – Vol. 3 – P.135-140.
5. Magnusson M., Gold nanoparticles: production, reshaping, and thermal charging / Magnusson M., Deppert K., Malm J., Bovin J., Samuelson L // J. Nanoparticle Res. – 1999. – Vol. 1. – P. 243–251.
6. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. / Jung J, Oh H, Noh H, Ji J, Kim S. // J. Aerosol Sci. – 2006. – Vol. 37. - P. 1662–1670.
7. Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation / Mafune F, Kohno J, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H // Phys Chem B. - 2000. - Vol.104. - P. 8333–8337.
8. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method / Tien D.C., Tseng K.H., Liao C.Y., Huang J.C., Tsung T.T. // Journal of Alloys and Compounds – 2008. – Vol. 463. - P. 408–411.
9. Progressive approach for metal nanoparticle synthesis / Siegel J, Kvítek Ondřej, Ulbrich Pavel, Kolská Z, Slepíčka P, Švorčík V. // Materials Letters. - 2012. – Vol. 89. - P. 47–50.

10. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications / Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. // *Nanopart Res.* – 2008. Vol.10. - P. 507–517.
11. Senapati S. Biosynthesis and immobilization of nanoparticles and their applications / A. Ahmad, S. Senapati, R. Kumar, M. Sastry // *Journal of Nanomaterials* - 2005. - P. 1–57.
12. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis* / Kalishwaralal K., Deepak V., Ramkumarpandian S., Nellaiah H., Sangiliyandi G. // *Mater Lett.* – 2008. – Vol. 62. - P. 4411–4413.
13. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated / Klaus T., Joerger R., Olsson E., Granqvist C. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 96. P. 13611–13614.
14. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria / Shahverdi A., Minaeian S., Shahverdi H., Jamalifar H., Nohi A. // *Biochemistry.* - 2007. – Vol. 42. P. 919–923.
15. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium* *Colloids and Surfaces* / Vigneshwaran N, Kathe A., Varadarajan P., Nachane R., Balasubramanya R. // *Biointerfaces* – 2006. – Vol. 53. - P. 55–59.
16. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green // Chem.* – 2011. Vol. 13. - P. 2638–2650.
17. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract / Vilchis-Nestor A., Sánchez-Mendieta V., Camacho-López M., Gómez-Espinosa R., Camacho-López M., Arenas-Alatorre // *J. Materials Letters* – 2008. – Vol. 62. - P. 3103–3105.
18. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts / Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D. // *Biointerface* – 2009. – Vol. 71. - P. 113–118.

19. Size-controlled synthesis of nanoparticles. Measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections / Evanoff, Chumanov G. // *J Phys Chem* - 2004. Vol. 108. P. 13957–13962.

20. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles / W Sally D. Solomon, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan et al. // *Journal of Chemical Education* – 2007 - Vol. 84, № 2 - P. 322-328.

21. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review / Brust M, Kiely C. // *Colloids Surf A: Phys Eng Aspects* – 2002. – Vol. 202. - P. 175–186.

22. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Hydroxyl Functionalized Ionic Liquids and Their Antimicrobial Activity / Dorjnamjin, D., Ariunaa // *J. Mol. Sci.* – 2008. Vol. 9. – P. 807-820.

23. SONOCHEMICAL SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES IN THE IONIC LIQUID 1-ETHYL-3-METHYLIMIDAZOLIUM TRIFLUOROMETHYLSULFONATE / Hala K Farag // *Journal of Pure and Applied Sciences* – 2015. - Vol. 9, №. 2. - pp. 3455-3460.

24. AFM and STM Studies on the Surface Interaction of [BMP]TFSA and [EMIm]TFSA Ionic Liquids with Au(111) / Atkin R., R., Zein El Abedin, S., Gasparotta, LHSet al. // *J. Phys. Chem.* – 2009. – Vol. 113. – P. 13266-13272.

25. Employing Plasmas as Gaseous Electrodes at the Free Surface of Ionic Liquids: Deposition of Nanocrystalline Silver Particles / Meiss, S., Rohnke, M., Kienle, L., et al. // *ChemPhysChem.* - 2007. - Vol. 8. - P.50-53.

26. S. A. Maier. *Plasmonics: Fundamentals and Applications* // Springer-Verlag. - New York, 2007. pp. 21–34.

27. Wilcoxon, J. Optical absorption properties of dispersed gold and silver alloy nanoparticles // *J. Phys. Chem.* – 2009. - Vol. 113. - P. 2647-2656.

28. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing / B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundström // *Sens. Actuators* – 1991 - Vol. 4. - pp. 299–304.

29. Silver Nanoparticle Applications and Human Health / Ahamed, M., Alsalhi M. // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 411. - P. 1841-1848.
30. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity / Liangpeng Ge, Qingtao Li, Meng Wang, Jun Ouyang, Xiaojian Li, and Malcolm MQ Xing // *Int J Nanomedicine.* – 2014. - Vol. 9. – P. 2399–2407.
31. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications / Gonçalo Doria, João Conde , Bruno Veigaset al. // *Sensors* – 2012. – Vol. 12. – P. 1657-1687.
32. Synthesis of silver nanoparticles on carbon papers for electrochemical catalysts / Hsieh C., Pan C., Chen W. // *J Power Sources* – 2011. Vol. 196. P.6055–6061.
33. Structure and function of nanoparticle–protein conjugates / Aubin-Tam, M.E., Hamad-Schifferli, K., // *Biomed. Mater* - 2008. Vol. 3. P. 155-158.
34. Synthesis, Characterization and Applications / Perez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzan L, Mulvaney P. *Gold Nanorods* // *Coordination Chemistry Reviews* – 2005. Vol. 249. – P. 1870–1901.
35. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods / Huang X., El-Sayed I., El-Sayed M. // *Journal of the American Chemical Society* – 2006. - Vol. 128, № 6. - P. 2115–2120.
36. Microfluidic immunosensor systems / Bange, A. Halsall, H.B., Heineman, W.R. // *Biosensors and Bioelectronics* -2005. - Vol. 20. - pp. 2488–2503.
37. Price C., The evolution of immunoassay as seen through the journal *Clinical Chemistry* // *Clin Chem* 44. – 1998. - P. 2071-2074.
38. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches / Ghindilis AL, Atanasov P, Wilkins M, Wilkins E. // *Biosens Bioelect.* – 1998. - Vol. 13. – P. 113-131.
39. Morgan CL, Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine / Morgan CL, Newman DJ, Price CP. // *Clin Chem.* – 1996. - Vol. 42. - P. 193-209.

40. Lu B, Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors/ Lu B, Smyth M, O'Kennedy. // Analyst – 1996. – Vol. 121. - P 29-32.

41. A piezoelectric immunosensor for Leishmania chagasi antibodies in canine serum / Joilson Ramos-Jesus, Kellyanne A., Carvalho and Rosana A et al. // Bioanal Chem. – 2011. Vol. 401. - P. 917–925.

42. Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin / Yang J, Gao P, Liu YR, Hongmin Ma, DuB, Wei Q.// Biosens Bioelect. - 2015. – Vol. 64. - P. 13-18.

43. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms / Zacco E, Galve R, Marco M. et al. // Biosens Bioelect. – 2006. – Vol. 21, № 7. - P. 1291-1301.

44. Kricka LJ. Optical tweezers and immunoassay // Clin Chem. – 1997. – Vol. 43. P. 251- 253.

45. Validation of Immunoassays for Bioanalysis / Findlay J., Smith W., Lee J., Nordblom G. et al. // Pharm Biomed Anal. – 2000. – Vol. 21. P. 1249–1273.

46. Козицина А.Н., Электрохимический иммуносенсор для диагностики клещевого энцефалита , Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук, / Екатеринбург, 2003.

47. Tang D., Magnetic core-shell Fe₃O₄-Ag nanoparticle-coated carbon paste interface for studies of carcinoembryonic antigen in clinical immunoassay / Tang D., Yuan R., Chai Y.// Phys. Chem. B. – 2006. - Vol. 110. - P. 11640–11646.

48. A novel magnetic particle-modified electrochemical sensor for immunosensor applications / Z. Altintas, S. S. Kallempud, U. Sezerman, Y. Gurbuz // Sensors and Actuators – 2012. – Vol. 174. - P. 187–194

49. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B₁ in barley / Nagwa H.S. Ammida^a, Laura Miche // Analytica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 520. – P. 159–164.

50. A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B₁ determination in milk / Yun Tan, Xia Chu', Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu // *Analytical Biochemistry* – 2009. – Vol. 387. – P. 82–86.

51. Development of an Immunomagnetic Electrochemical Sensor for Detection of BT-CRY1AB/CRY1AC Proteins in Genetically Modified Corn Sample / G. Volpe, N. H. Ammid, D. Moscone, L. OcchigrossiPalleschi // *Analytical Biochemistry* – 2006. – Vol. 39. - P. 255-267.

52. Aflatoxin and Genetically Modified Organisms Analysis in Turkish Corn / Nevzat Artik, Nevzat Konar, Muhip Özkan, M. Lütfü Çakmakç // *Food and Nutrition Sciences* - 2016. - Vol. 7., - P. 138-148.

53. Determination of Genetically Modified Corn and Soy in Processed Food Products. / Sönmezoğlu, Ö.A. and Keskin // *Journal of Applied Biology and Biotechnology* – 2015. - Vol. 3. - P. 032-037.

54. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds / Klein A.P., Brune K.A., Petersen G.M., Goggins M., Tersmette A.C., Offerhaus G.J., Griffin C., Cameron J.L., Yeo C.J., Kern S., et al. // *Cancer Res.* – 2004/ - Vol. 64. P. 2634–2638.

55. Autocrine induction of invasion and metastasis by tumor-associated trypsin inhibitor in human colon cancer cells / Gouyer V., Fontaine D., Dumont P., de Wever O., Fontayne-Devaud H., Leteurtre E., Truant S., Delacour D., Drobecq H., Kerckaert J.P., et al. // *Oncogene* – 2008. – Vol. 27. – P. 4024–4033.

56. PRSS3 promotes tumour growth and metastasis of human pancreatic cancer / Jiang G., Cao F., Ren G., Gao D., Bhakta V., Zhang Y., Cao H., Dong Z., Zang W., Zhang S., et al. // *Gut.* – 2010. – Vol. 59. P. 1535–1544.

57. Increased serum levels of tumour-associated trypsin inhibitor independently predict a poor prognosis in colorectal cancer patients / Gaber A., Nodin B., Hotakainen K., Nilsson E., et al. // *BMC Cancer* – 2010. – Vol. 10. – P. 498.

58. Pre-diagnostic levels of anionic trypsinogen, cationic trypsinogen, and pancreatic secretory trypsin inhibitor in relation to pancreatic cancer risk /

Johansen D., Manjer J., Regner S., Lindkvist B. // *Pancreatology* – 2010. Vol. 10. - P. 229–237.

59. *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles* / W Sally D. Solomon, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan A. et al. // *Journal of Chemical Education* – 2007. - Vol. 84, № 2. – P. 322-325.

60. *Interaction of Silver Nanoparticles with Serum Proteins Affects Their Antimicrobial Activity In Vivo* / Divya Prakash Gnanadhas, Midhun Ben Thomas, Rony Thomas et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2013. - Vol. 57, № 10. - P. 4945– 4955.

61. *Highly Specific Electrochemical Analysis of Cancer Cells using MultiNanoparticle Labeling* / Ying Wan, Yi-Ge Zhou, Mahla Poudineh, Tina Saberi Safaei et al. // *Chem. Int.* – 2014. Vol. 53. - P. 13145 –13149.

62. *Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms* / Zacco E, Galve R, Marco M. et al. // *Biosens Bioelect.* – 2006. – Vol. 21, № 7. - P. 1291-1301.

63. *Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: tailor-made or universal?* / Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV // *Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 188. - P. 1610–1611.

64. *Preparation and quality control of silver nanoparticle–antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays* Mateusz S. Szymanski, Robert A. Porter *Journal of Immunological Methods* 387 (2013) 262–269

65. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения). Методические рекомендации ПНД Ф 12.13.1-03 (УТВ. ФГУ «Центр экологического контроля и анализа» 04.09.2003)

66. *Расчёт искусственного освещения. Методические указания к выполнению индивидуальных заданий для студентов дневного и заочного обучения всех направлений и специальностей ТПУ. – Томск: Изд. ТПУ, 2008. – 20 с*

67. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.

68. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.

69. Строительные нормы и правила СНиП 23-05-95. Естественное и искусственное освещение (утв. постановлением Минстроя РФ от 2 августа 1995 г. N 18-78) (с изменениями от 29 мая 2003 г.).

70. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009.

71. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Раздел 3 EXPEREMENTAL RESULTS

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Христунова Екатерина Петровна		

Консультант кафедры _____ ИПР _____:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор каф. ФАХ	Короткова Е.И.	д.х.н., профессор		

Консультант – лингвист кафедры _____ ИЯП _____:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ст.пр.каф. ИЯПР	Рыманова И.Е.	старший преподаватель		

Chapter 3 Experimental results

3.1 Characterization of synthesized nanoparticles.

In the literature one can find lots of original methods of producing silver nanoparticles: chemical, physical and biological. In present work, silver nanoparticles were synthesized by means of chemical reduction of AgNO_3 in a sodium borohydride solution, at the same time, it should be noted that variation of the synthesis conditions, i.e. the type of the reductant, the concentrations ratio, etc., significantly effect on stability and the size of the nanoparticles. If all the experimental conditions are strictly complied (temperature control, constant stirring), the present method allows to synthesize nanoparticles of 12 ± 2 nm size, having a well-defined plasmonic adsorption at the wavelength of $\lambda = 390\text{-}400$ nm (the method of synthesis is described in Section 2.4.1). In present work, formation of the silver nanoparticles was studied using the spectrophotometric method (the method is described in the Section 2.4.4). According to the literature, silver nanoparticles have a characteristic peak at the wavelengths of 390 to 400 nm. Absorption spectra of the synthesized nanoparticles are presented in Fig. 3.1.

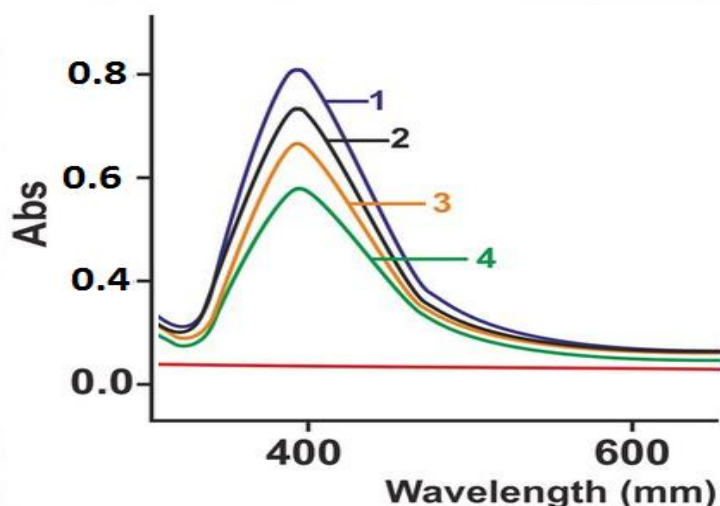


Fig. 3.1 - Dependence of nanoparticles absorption characteristics on their concentration: 1 – $C_M(\text{Ag NP's}) = 1,6 \cdot 10^{-4}$ M, 2 – $C_M(\text{Ag NP's}) = 1,9 \cdot 10^{-4}$ M, 3 – $C_M(\text{Ag NP's}) = 2,2 \cdot 10^{-4}$ M, 4- $C_M(\text{Ag NP's}) = 2,5 \cdot 10^{-4}$ M

As clearly seen from Fig. 3.1, absorption spectra of the synthesized nanoparticles exhibit characteristic peak at $\lambda_{\max}=395$ nm, which in a good agreement with the literature. The decrease of concentration of the silver nanoparticles leads to the decrease of adsorption which indicates that nanoparticles are presented on the solution. All optical density measurements were carry out according to deionized water.

The size and shape of the synthesized nanoparticles were determined by means of the Transmission Electron Microscopy (TEM) (detailed description of the TEM is presented in the Section 2.4.5). The TEM micrograph of the silver nanoparticles and their size distribution are presented in Fig. 3.2 and 3.3, respectively.

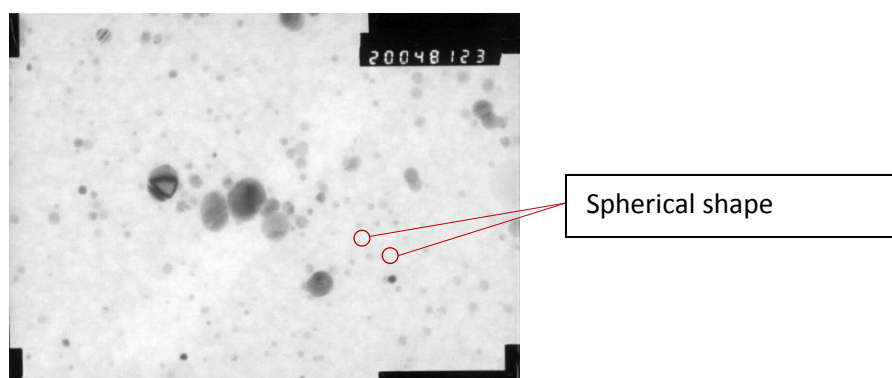


Рисунок 3.2 - TEM micrograph of the silver nanoparticles.

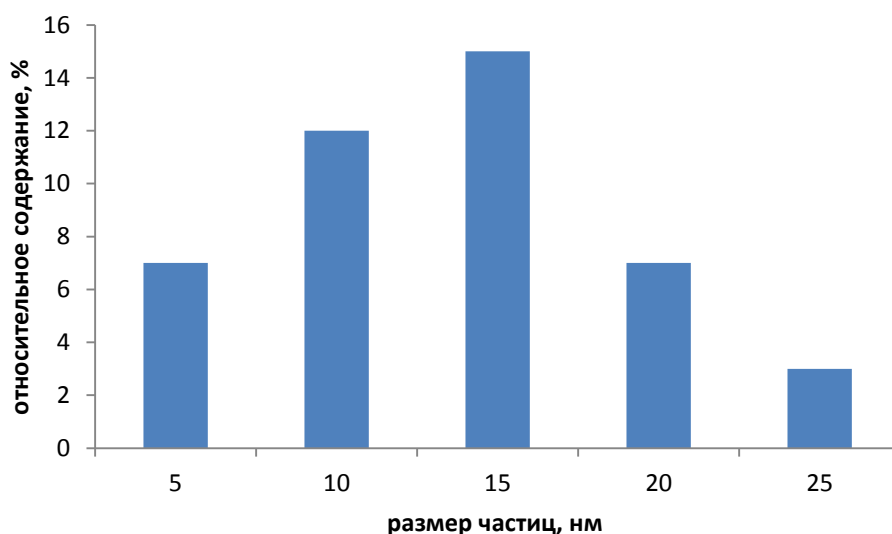


Fig. 3.3 - The histogram silver nanoparticles size distribution.

According to Fig. 3.2 and 3.3, the synthesized silver nanoparticles have a spherical shape and an average size of 15 nm. Stability of the nanoparticles is directly dependent on the concentrations ratio between NaBH₄ and AgNO₃. The optimal ration is presented in Table 3.1.

Table 3.1 Dependence of nanoparticles stability on the NaBH₄ concentration.

[NaBH ₄]/[AgNO ₃]	Colloid lifetime
2/1	Stable for a monts
2.1/1	30 min
1.8/1	5 min

Thus silver nanoparticles were obtained with an average size of 15 nm and spherical shape, which were used for biokonjugates preparation-based on BSA and antibodies against encephalitis.

3.2 Characterization of the silver nanoparticles-based bioconjugates

3.2.1 Characterization of bioconjugates based on silver nanoparticles and the Bovine Serum Albumin (BSA).

In general Serum albumin, is presented in blood plasma, where sole polypeptide chain consists of 583 amino acid residues. Some of the residues in the BSA contain sera-, oxygen- and nitrogen-containing groups. These groups can stabilize surface of nanoparticles. Protein molecules of t BSA were synthesized in aqueous solution at concentration of 0.5% to 5 %.

The next stage of the experiment is a synthesis of the bioconjugate which is based on the model protein of bovine serum albumin, containing silver nanoparticles (the method is described in Section 2.4.2). The absorption spectra of the obtained bioconjugates are presented in Fig. 3.4.

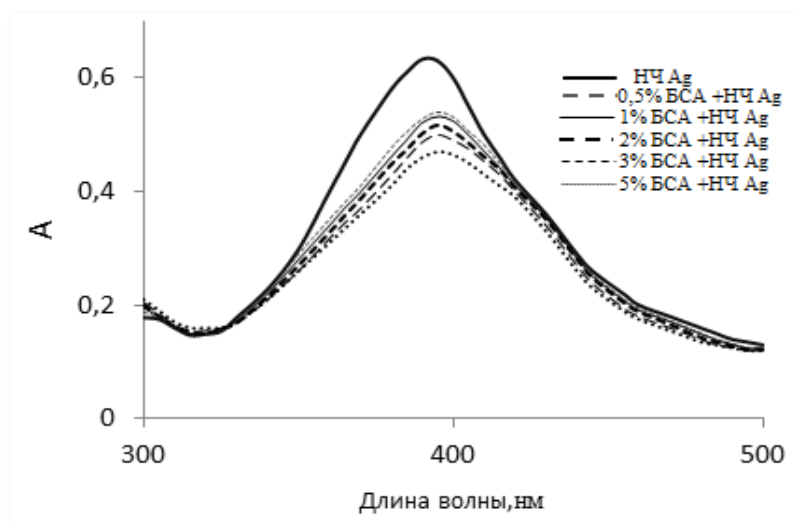


Fig 3.4 - Absorption spectra of BSA/silver nanoparticles system.

From Figure 3.4 one can see that change of the BSA concentration leads to the shift of the adsorption maximum in the region of longer wavelengths. This gives us a reason to suggest that interaction occurred between BSA and silver nanoparticles. It is well known, that BSA affects stabilization of silver nanoparticles. This stabilization leads to the increase of nanoparticles size.

The obtained bioconjugates were studied by means of the TEM. The resulting TEM micrograph is presented in Fig. 3.5. From Figure 3.5 one can clearly see the increase of nanoparticles size.

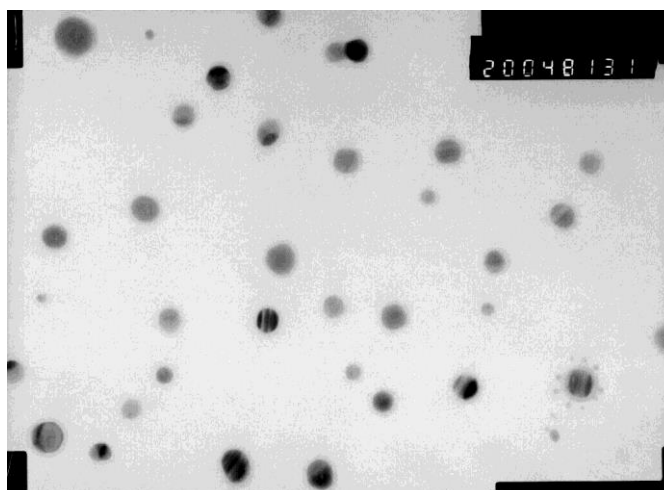


Fig. 3.5 - TEM micrograph of BSA/silver nanoparticles system

The histogram of bioconjugate size distribution is presented in Fig. 3.6.

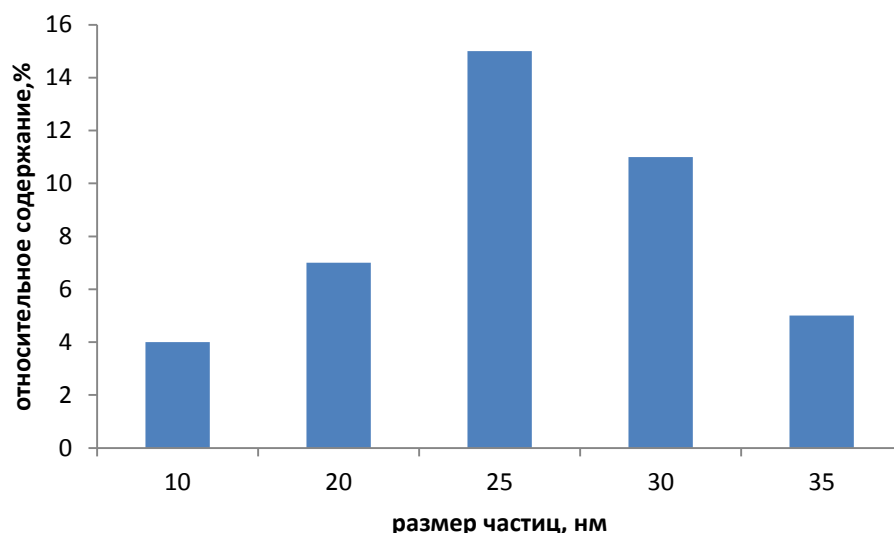


Fig. 3.6 - Histogram of bioconjugates size distribution.

Protein molecules stabilized silver nanoparticles, the average size of bioconjugates based on the BSA is 25 nm.

3.2.2 Charaterization of the bioconjugates base on the silver nanoparticles and the human immunoglobulin.

It is necessary for electrochemical test system very important to find the biological material working by type «antigen-antibody». It was suggested to get bioconjugate based on antibodies against encephalitis.

Human immunoglobulin against encephalitis contains an active fraction of the protein. This protein can be extracted from serum or plasma. It contains antibodies, which are specific to the encephalitis. In order to obtain this protein, blood plasma can be used. Blood plasma can be extracted from blood of healthy donors, who were tested for Hepatitis C and HIV tests. As a stabilizer, Glycine (aminoacetic acid) is used [2].

In the present work, the bioconjugates based on silver nanoparticles and the human immunoglobulin were synthesized (the detailed description of the bioconjugates synthesis is presented in Section 2.4.3). The absorption spectra of silver nanoparticles and their bioconjugates are presented in Fig. 3.7. From these spectra one can clearly observe a shift of the absorption maximum in the direction

of long wavelengths with the change of the immunoglobulin concentration. Also, the decrease of incident light attenuation was observed. The obtained results give us reasons to suggest that interaction occurred between immunoglobulin and silver nanoparticles.

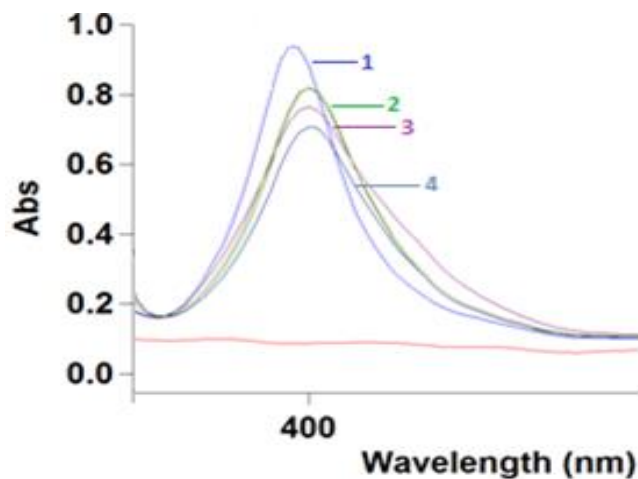


Fig. 3.7 - The absorption spectra of silver nanoparticles/immunoglobulin system at different concentrations of immunoglobulin:

- 1- silver nanoparticles (C = 10 mkg/ml)
- 2 - bioconjugate C (Ag NP's)= 10 mkg/ml + 0,5 % immunoglobulin
- 3 - bioconjugate C (Ag NP's)= 10 mkg/ml + 3% immunoglobulin
- 4 - bioconjugate C (Ag NP's)= 10 mkg/ml + 5% immunoglobulin.

3.3 Determination of the molecules charge

In the literature three possible mechanisms of metallic NPs/biocunjugare interaction are described (Fig. 3.8). The first one is based on the electrostatic interaction. The second one, in turn, takes place by means of hydrophobic interaction. And the third one- by means of covalent interaction.

In our study, the existence of the second mechanism, hydrophobic mechanism, was proposed. In order to prove this hypothesis, the charge of the particles and bioconjugates was determined by means of the horizontal gel electrophoresis (the method is described in Section 2.4.5). According to the literature, silver nanoparticles are surrounded by borohydride shell with having negative charge. Therefore, the charge of the molecule must be negative.

This suggestion was confirmed by means of the horizontal gel electrophoresis (Fig. 3.9). Moreover, from Figure 3.9 it can be seen that BSA- and immunoglobulin-based bioconjugates move towards the anode which indicates that their charge is negative.

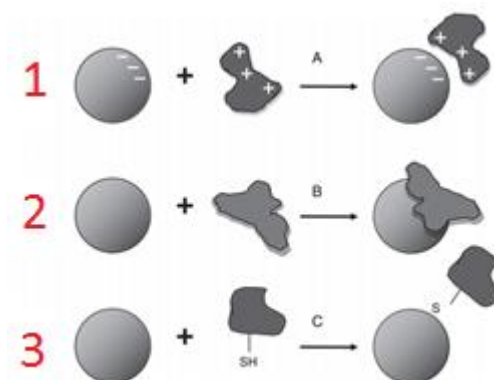


Fig. 3.8 - Different types of interaction between metal nanoparticles and proteins. A — electrostatic, B — hydrophobic, C — dative bonds

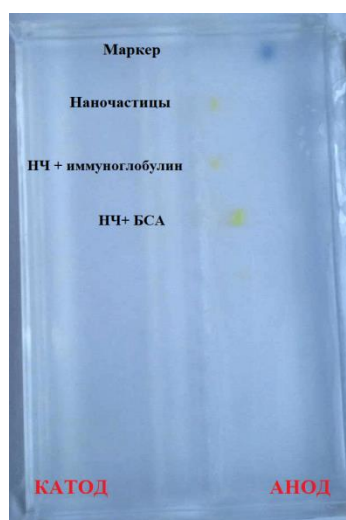


Fig. 3.9 - Horizontal gel electrophoresis.

According to the data presented in Fig. 3.9, the charge of the silver nanoparticles and their bioconjugates is negative. This fact gives us reason to suggest that formation of biocomplexes occurs according to the hydrophobic mechanism.

3.4 Development of electrochemical immunosensor based on bioconjugates

One of the main objectives of this work was the possibility of using the obtained bioconjugates for the future development of electrochemical immunosensors working by affine binding (antigen-antibody) in a "sandwich system". In our study protein drug antigen of encephalitis (manufacturer "Microgen", Russia, Tomsk) was used for developing electrochemical immunosensor. The proteins which were immobilized on thiolated surface of gold-ensemble electrode according to the method presented in Section 2.4.6.

Development of electrochemical immunosensor was a complex multistep task, which consisted of the antigen bioactive layers production on the gold-electrode ensemble and study the electrochemical properties of the obtained silver nanoparticles and their bioconjugates based on BSA and immunoglobulin against encephalitis at all steps of the "sandwich system" formation.

3.4.1 Investigation of electrochemical properties of silver nanoparticles and their bioconjugates on gold-ensemble electrode

On the first step the electrochemical properties of silver nanoparticles on the gold-ensemble electrode (GEE) were studied. The gold ensemble electrode preparation was done due to the method presented in Section 2.4.6.

The cyclic voltammogram of the reduction-oxidation of silver NP in the presence of chloride ions on gold-ensemble electrode is presented in Fig. 3.10.

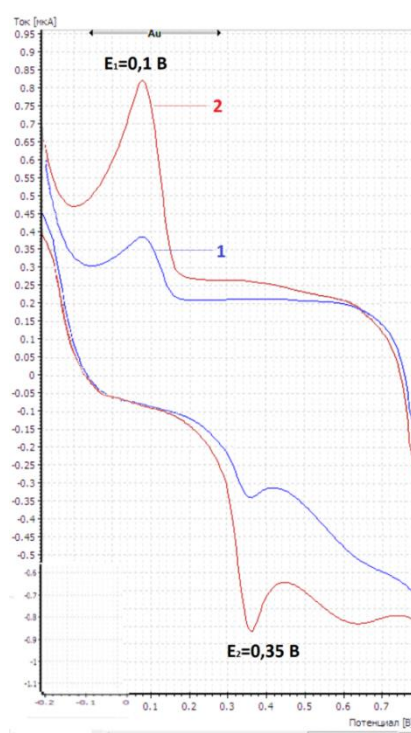
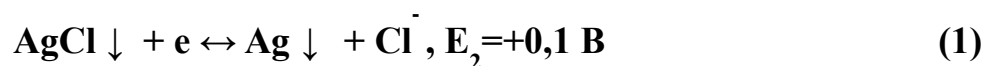


Figure 3.10 - Cyclic voltammogram oxidation -reduction of SNP's on gold-ensemble electrode, $W=100$ mV/s, $E_{acc}=-0,8V$. Background electrolyte: ($KCl-1 \cdot 10^{-2}$ M + $HNO_3-0.1$ M); 1 – SNP's($6.6 \cdot 10^{-8}$ M); 2 – SNP's ($13.2 \cdot 10^{-8}$ M).

According to Fig. 3.10 the oxidation-reduction signals from silver chloride are observed at potentials $E_k = 0.1V$, $E_a = 0,35V$. The electrolysis process occurs according to the equation:



It should be noted that after adding the silver nanoparticles into the cell they were destroyed to the ionic form of silver, followed by the formation of AgCl on the surface on gold-ensemble electrode. The signals were registered from dewstroyed nanoparticles. Background electrolyte solution which consist of 0.01 M HNO_3 in the presence of $1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³ KCl influence the nanoparticles destroying.

Confirmation of the degradation of silver NP's in the background electrolyte is the spectrophotometric investigation of silver nanoparticles in the absence and in the presence of chloride ions in acidic conditions (Fig.3.11).

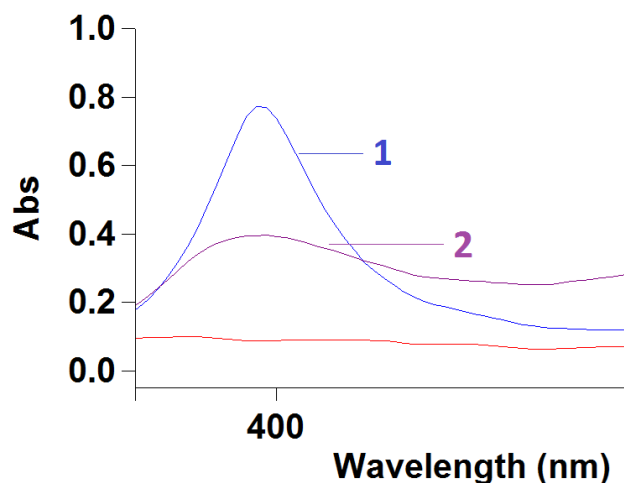


Figure 3.11 – 1-Absorption spectra of silver nanoparticles 10 μ g/ml in deionized water, 2- Absorption spectra of silver nanoparticles 10 μ g/ml in 0,1 M potassium chloride

From Figure 3.11 one can see that after adding of potassium chloride in the system the absorption maximum at the wavelength of 395 nm decreases, which is due to degradation of SNP's with the formation of poorly soluble compound of AgCl .

In further investigations to determine the silver NP's cathode region in the range of potentials from 0.8 V to minus 0.2 V was selected. In Fig. 3.12 is presented the voltammogram of AgCl reduction at different times of electrolysis is presented.

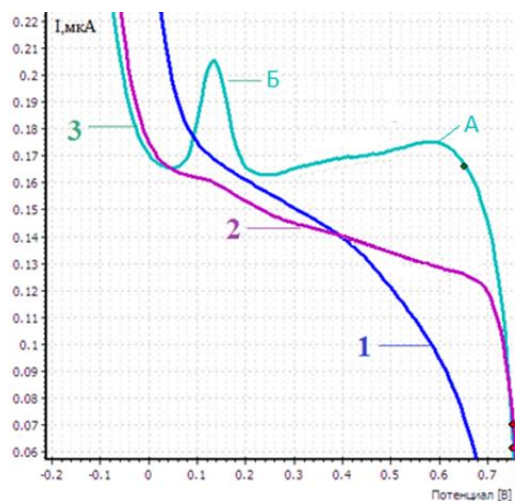


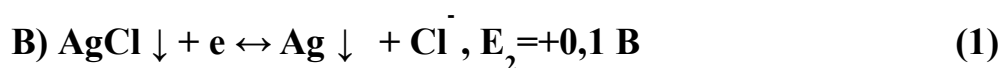
Figure 3.12 - Cathodic voltammogram of AgCl reduction,
 $W=100$ mV/s, $E_{occ}=-0,8V$

1 – background electrolyte: (KCl- $1 \cdot 10^{-2}$ M + HNO₃-0.1 M);

2 –SNP's($6,6 \cdot 10^{-8}$ M) $t_{\text{electrolysis}}=11$ min;

3 – SNP's ($6,6 \cdot 10^{-8}$ M) $t_{\text{electrolysis}}=22$ min.

Besides the AgCl reduction at the potential of $E_2=0$ V, there is a signal at the potential of $E_1=0.6$ V. The electrode mechanisms are presented by equations (1)-(2):



Cathode signal at a potential of 0.6 V corresponds to electrode process of the silver ions reduction. However, the signal of silver ions reduction at the potential of 0.6 V was poorly reproduced and all further research on the quantitative determination of the silver NP's and their bioconjugates in the electrochemical cell were carried out using the data signal AgCl reduction at the potential $E_2=0.1$ V.

The study of work conditions of electrochemical determination of silver nanoparticles

The electrochemical signal of the silver NP's, is associated with the accumulation of AgCl on the gold-ensemble electrode, then the necessary step to determine the work conditions was the step of the parameters selection in the cathodic voltammetry: potential accumulation, time accumulation, potassium chloride concentration and pH.

The determination of working conditions the electrochemical behavior AgCl were conducted by varying several parameters in the region of potentials from 0.8 V to minus 0.2 V (the method were described above). Figure 3.13 is presented the dependence of the AgCl reduction current from potential accumulation. At a potential accumulation minus 0,8 the maximum signal at a potential of 0.1 V was obtaine.

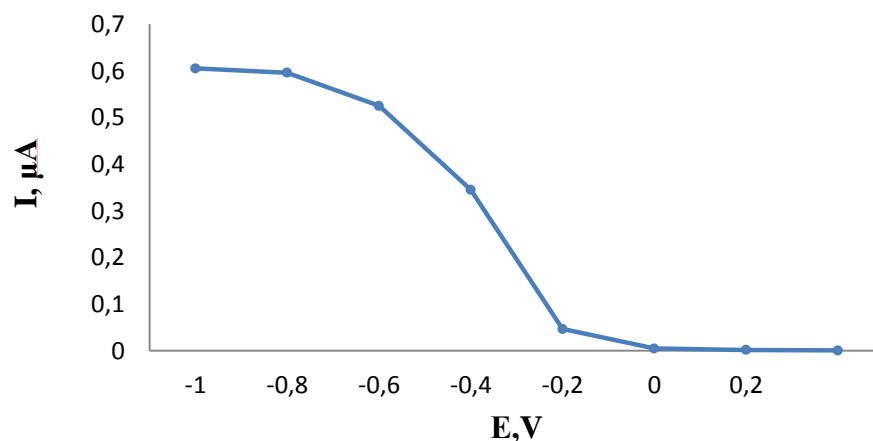


Figure 3.13 - The dependence of the reduction current from potential accumulation (SNP's – $6.6 \cdot 10^{-8} \text{M}$). $W = 100 \text{ mV/s}$

A further step was to study the effect of accumulation time on the analytical signal for the selected accumulation potential minus 0.8 V, the optimal time was 60 seconds then the signal increased but not much (Fig. 3.14).

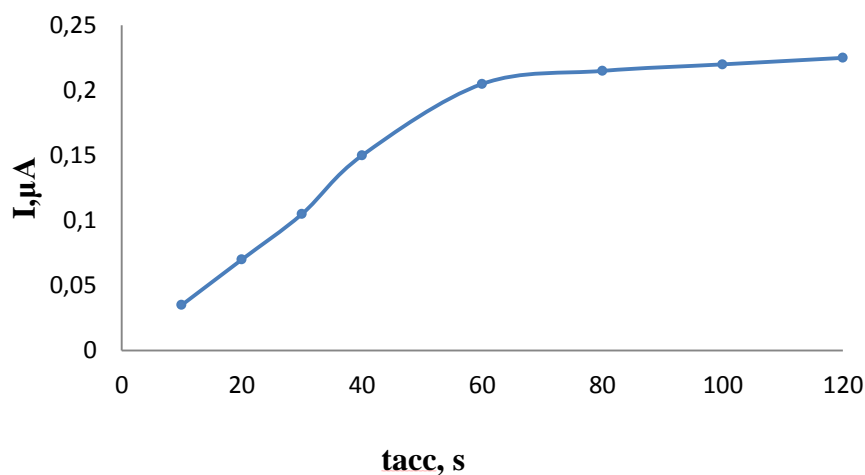


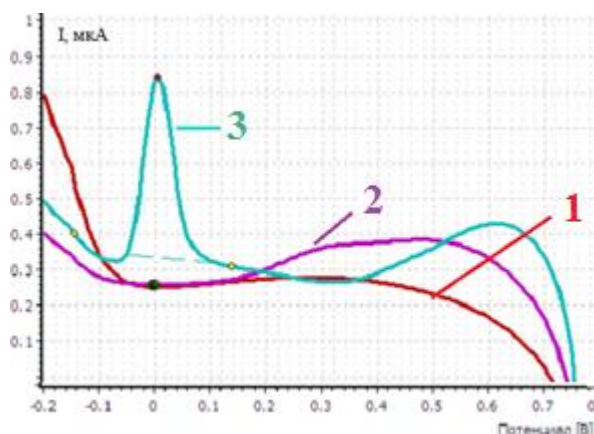
Figure 3.14 - The dependence of the reduction current from the time accumulation at constant potential accumulation ($E_{acc} = -0.8 \text{V}$). $W = 100 \text{ mV/s}$, (SNP's – $6.6 \cdot 10^{-8} \text{M}$)

A very important parameter for working with a signal at a potential of 0.1 V was the selection of concentrations of chloride ions in Table 3 is presented data, where of $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ is the most suitable the concentration.

Table 3.2 - Influence of the concentration of chloride ions

Concentration KCl, M	t ₃ , min	Signal	Current, μA
1*10 ⁻²	1,5	+	0,151
1*10 ⁻³	8	+	0,148
1*10 ⁻⁴	14	+	0,143
1*10 ⁻⁵	15	+	0,283
1*10 ⁻⁶	24	+	0,36
1*10 ⁻⁷	37	+	0,33

Figure 3.15 is presented the cathodic voltammogram AgCl in the absence and in the presence of HNO₃ (0.1 M).



According to Figure 3.15 the influence of pH on the degradation of the silver NP's and the formation of AgCl on the electrode surface followed by reduction at the electrode mechanism (1) obvious.

The working conditions of the electrochemical determination of silver nanoparticles via their degradation in acidic conditions and receiving a cathode signal from the AgCl are:

- Background electrolyte: HNO₃ (0.1M),
- The concentration of chloride ions in the cell : 1*10⁻² M;
- Scan rate : W=100 mV/s;
- Potential accumulation: E_{acc}=-0,8 V;
- Time accumulation: t_{acc}=60 s

Investigation of electrochemical properties of bioconjugates of silver NP's based on BSA and antibodies against encephalitis on gold-ensemble electrode.

At the selected working conditions the electrochemical properties of bioconjugates of silver NP's based on BSA and antibodies against encephalitis on gold-ensemble electrode were investigated.

In Fig. 3.16 is illustrated the voltammograms of the reduction AgCl from silver NP's and their biokonjugates based on BSA and antibodies against encephalitis is illustrated.

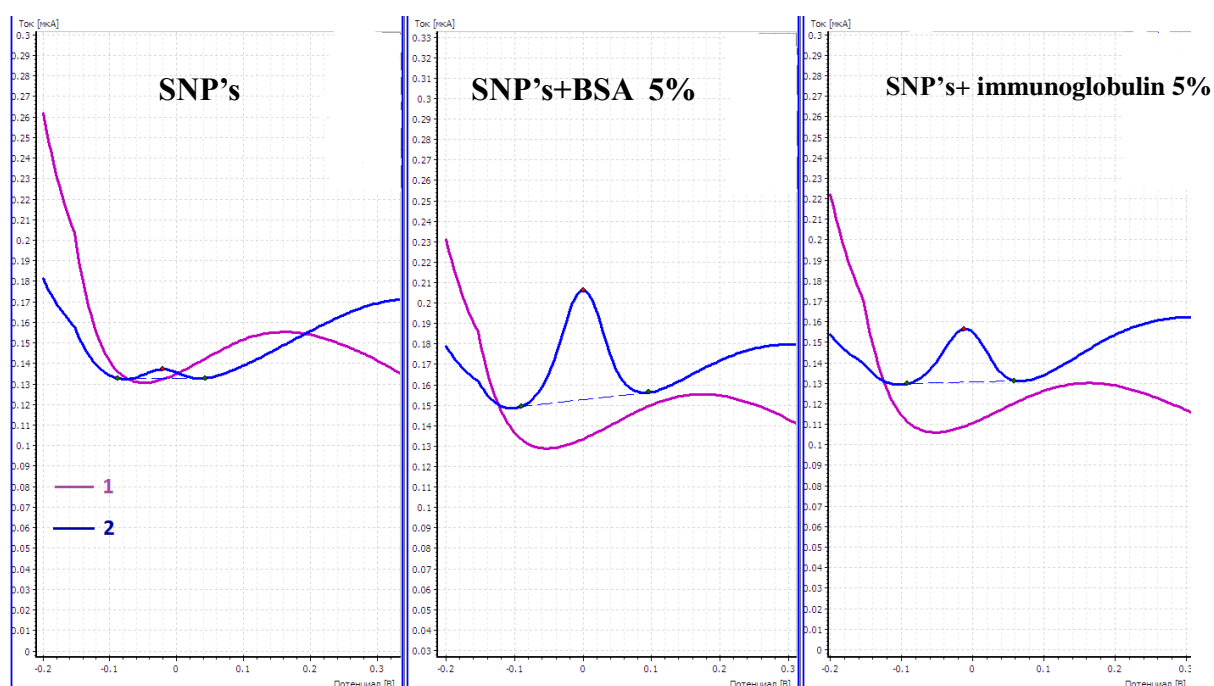


Figure 3.16 – Cathodic voltammograms reduction from silver nanoparticles and their bioconjugates. $W=100$ mV/s, $E_{acc}=-0,8V$. 1- Background electrolyte : (KCl- $1 \cdot 10^{-2}$ M + HNO_3 -0.1 M) 2-Silver NP's ($6,6 \cdot 10^{-8}$ M)

From Fig. 3.16 one can see that the development of the signal from AgCl after adding bioconjugate in an electrochemical cell arises much sooner in comparison with silver NP's without the protein. Later, the AgCl signal in the cell with silver nanoparticles was stabilized with regard to bioconjugates, due to the blocking of the electrode surface through adsorption of protein.

The obtained reduction peaks of AgCl from bioconjugates based on BSA and antibodies against encephalitis can be used as analytical signals in the

development of electrochemical immunosensor associated with the determination of the concentration by voltammetry. Reduction voltammograms of AgCl from the concentration of silver NP's and their bioconjugates is presented in figures 3.17,3.18,3.19.

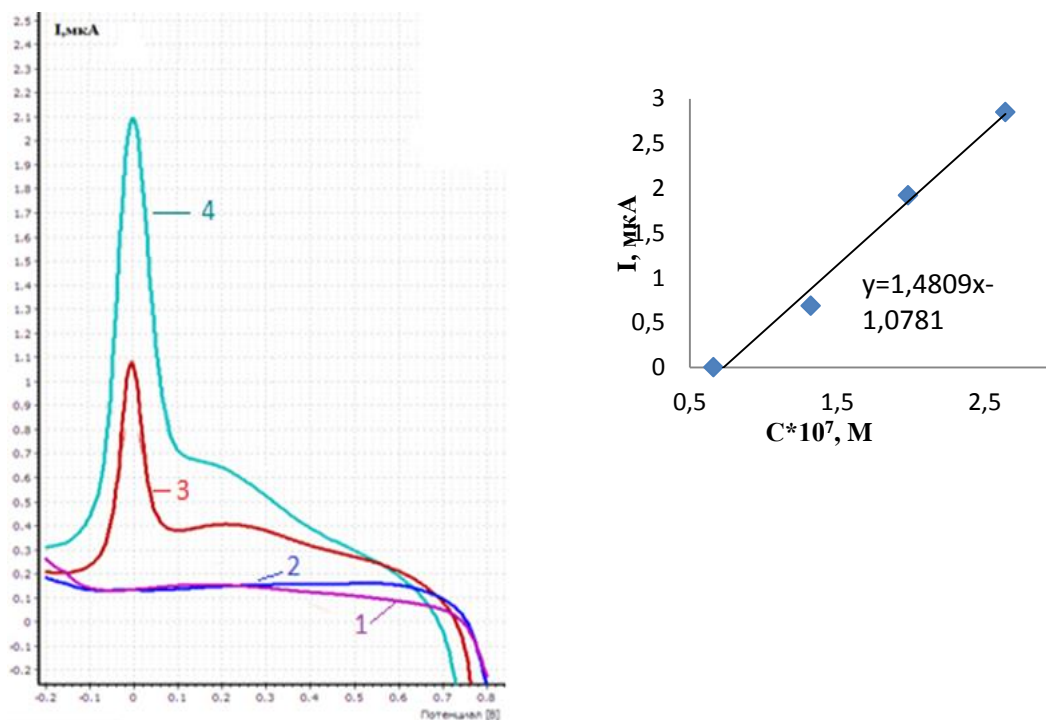


Figure 3.17 - Cathodic voltammogram of AgCl from the SNP's concentration which were added into the cell, $W=100 \text{ mV/s}$, $E_{\text{acc}}=-0,8\text{V}$. 1 – background: $(1 \cdot 10^{-2} \text{ моль/дм}^3 \text{ KCl} + 0,01 \text{ M HNO}_3)$; 2 - SNP's ($6,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$); 3 – SNP's ($13,2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$); 4 – SNP's ($19 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

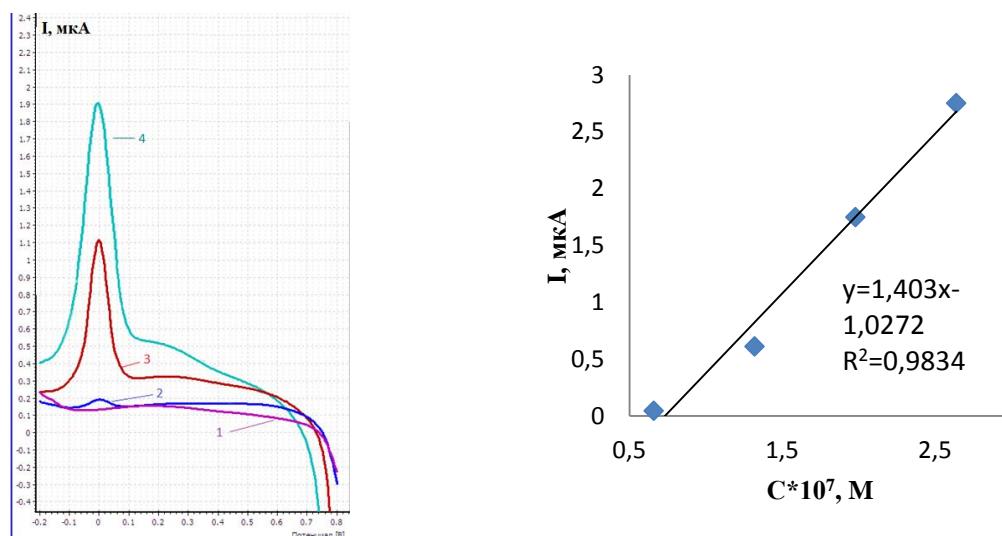


Figure 3.18. Cathodic voltammogram of AgCl from the bioconjugate (SNP's + BSA) concentration which were added into the cell, $W=100$ mV/s, $E_{acc}=-0,8V$. 1 -background: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + 0,01 M HNO₃); 2 - SNP's($6,6 \cdot 10^{-8}$ M) $1,5 \cdot 10^{-4}\%$ BSA; 3 - SNP's ($13,2 \cdot 10^{-8}$ M) + $3,0 \cdot 10^{-4}\%$ BSA; 4 - SNP's ($19 \cdot 10^{-8}$ M) + $4,5 \cdot 10^{-4}\%$ BSA.

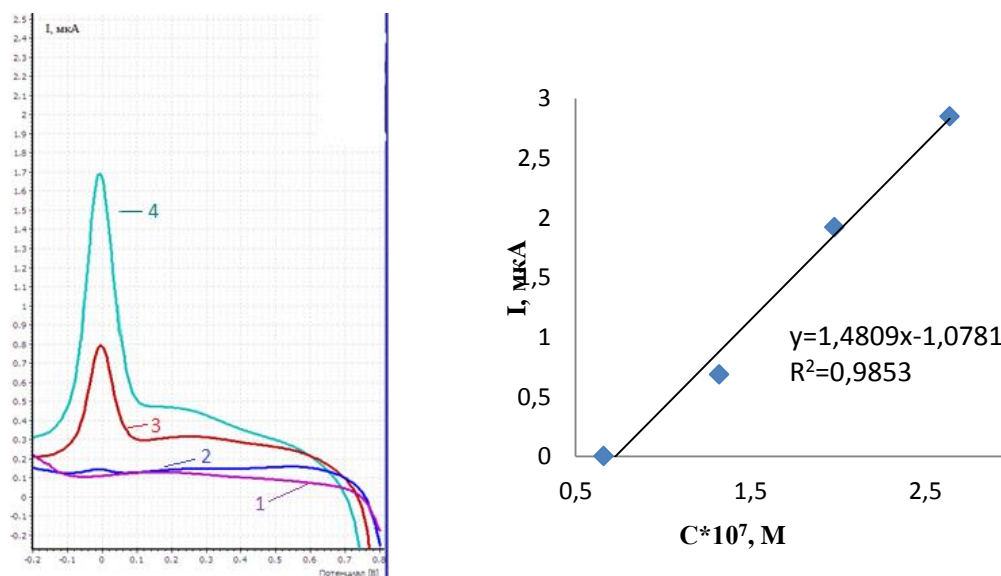


Figure 19. Cathodic voltammogram of AgCl for the bioconjugate (SNP's + immunoglobulin) concentration added into the cell , $W=100$ mV/s, $E_{acc}=-0,8V$. 1 – background: ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ KCl + 0,01 M HNO₃); 2 - SNP's($6,6 \cdot 10^{-8}$ M) $1,5 \cdot 10^{-4}\%$ immunoglobulin; 3 –SNP's ($13,2 \cdot 10^{-8}$ M) + $3,0 \cdot 10^{-4}\%$ immunoglobulin; 4 – SNP's ($19 \cdot 10^{-8}$ M) + $4,5 \cdot 10^{-4}\%$ immunoglobulin

According to Fig. 3.17, 3.18, 3.19 the linear dependence of the reduction current AgCl was observed in the concentration range from $6,6 \cdot 10^{-8}$ to $26,4 \cdot 10^{-8}$ mole/dm³. These conditions can be considered in the development of an electrochemical immunosensor for the quantitative determination of antibodies against encephalitis in biological objects.