

УДК: 602.1:53.082.9

ІМУННИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ISFETs З ОКСИД ЦЕРІЄВОЮ ЧУТЛИВОЮ ПОВЕРХНЕЮ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПАТУЛІНУ

Н. Ф. Слишик, аспірантка*

М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук, професор

Представлено фізико-хімічні та функціональні характеристики імунного біосенсора на основі оксиду церію ISFET. Пероксидаза хрому (HRP) слугувала міткою, її активність визначалась через основний зсув рН розчину аскорбінової кислоти в присутності H_2O_2 . За аналізу патуліну "конкурентним" способом визначена його концентрація становила до $1,0 \text{ нг/мл}^{-1}$ і лінійність в межах $5\text{-}200 \text{ нг/мл}^{-1}$. При "донасиченні" чутливість збільшувалась до $0,5 \text{ нг/мл}^{-1}$ з лінійністю в діапазоні $1,0\text{-}250 \text{ нг/мл}^{-1}$.

Ключові слова: ISFET, оксид церію, імунний біосенсор, патулін, визначення.

Проблема мікотоксикозів отримала дуже велике значення в світі. Проведення органолептичного аналізу, навіть за наявності плісняви, не завжди означає погану якість продукції, і це не дає жодних гарантій для запобігання загрози отруєння організму, збереження врожаю і отримання високоякісного посадкового матеріалу. Нині вміст ряду мікотоксинів регулюється з використанням традиційних методів, заснованих на різних видах рідкої і газової хроматографії в (LC і GC), у тому числі їх високоефективних варіантів (HPLC і HRGC) з мас-спектроскопією (MS) і мас-спектрометрією з високою роздільною здатністю реєстрації аналітів (HRMS).

*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб

Існуючі підходи можуть забезпечити чутливість на максимально допустимих рівнях концентрації мікотоксинів в продуктах харчування, але вони дуже складні і не виконують практичних вимог до простоти і чутливості аналізу.

Але на жаль, їх важко застосовувати на практиці, особливо через термін виконання аналізу і неможливість проводити його в польових умовах. Ці вимоги можуть бути виконані тільки методами, заснованими на сучасних принципах біосенсорики. Нами розроблено ряд імунних біосенсорів на основі поверхневого плазменного резонансу (SPR), повного внутрішнього віддзеркалення еліпсометрії (TIRE), нано-структурованого пористого кремнію з хемілюмінесцентним і біолюмінесцентним підходами для контролю рівня Т2-мікотоксинів, афлатоксину, зеареленону, патуліну та ін. [2, 9-11, 13-15]. Використовуючи іонн-чутливі польові транзистори (ISFETs), як датчики імунного біосенсора, призначеного для реєстрації деяких низькомолекулярних речовин, ми спробували досягти простоти і дешевизни аналізу [12]. За останніми даними [8] ми маємо можливість використовувати оксид церію замість нітриду кремнію, і нами вивчено його особливості в ISFETs на основі імунного біосенсора за контролю рівня *Salmonella Typhimurium*. Установлено, що така модифікація дозволила не тільки підвищити стабільність імунного біосенсора, але й отримати вищу чутливість аналізу.

Патулін має молекулярну масу близько 154 дальтон з емпіричною формулою $C_7H_6O_4$ і продукується грибками роду: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* і *Raecilomyces*. Овочі, фрукти, особливо яблука часто забруднені цим токсином. Міжнародне агентство з вивчення раку на підставі дослідження токсичності патуліну віднесло його до канцерогенів третьої групи або речовин, для яких є недостатньо даних для достовірної класифікації [1]. Тим не менш, він був класифікований як канцерогенна, мутагенна і цитотоксична речовина [5, 14, 16]. Міжнародні та національні агентства з регулювання рівня патуліну встановили допустиму норму концентрації в межах 20-50 мкг/кг [6]. Метою дослідження було розробити методику створення імунного біосенсора на основі

оксиду церію ISFETs, і провести аналіз результатів та вивчити ефективність роботи за визначення рівня патуліну в модельних розчинах і в деяких реальних зразках.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. А. Отримання специфічних імунних компонентів.

Специфічні IgG отримані з Agrisera (Швеція). Вони були розчинені в 0,5 мМ 5 мМ Na-фосфатному буфері (рН 7,3), що містив 100 мМ NaCl (PBS). Синтез кон'югатів патуліну з пероксидазою хрому (HRP) і бичачим сироватковим альбуміном (BSA) був виконаний у кілька етапів відповідно до схеми, описаної раніше [3]. Специфічні IgG були марковані HRP за стандартами процедури із застосуванням глутаральдегіду (GA) [10]. Усі реагенти були придбані в "Sigma-Aldrich" (США).

Б. Технологія створення ISFETs, деякі характеристики та підготовка імунних біосенсорів.

Технологія створення ISFETs була описана в [10]. Нами використано стандартну електронну технологію. Для отримання рівномірної товщини плівки напилення церію проводилося у два етапи. Після першого етапу планшет нагрівали до температури 180° С. Окислення церію здійснювали в дифузній печі при температурі 300° С в кисневому середовищі. Для стабілізації реакції оксиду церію ISFET плівку покривали тонким шаром оксиду кремнію, який був вирощений на підкладці шляхом термічного окислення.

Зображення поверхні оксиду церію за допомогою атомно-силової мікроскопії показано на рис. 1.

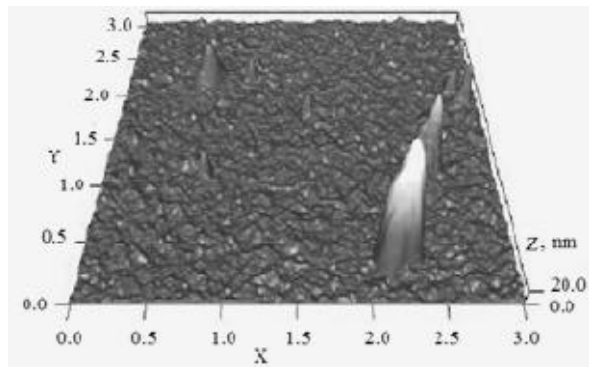


Рис. 1. Поверхня оксиду церію під атомно - силовою мікроскопією, де розміри по осях X і Y в мкм.

С. Виявлення патуліну за допомогою імунного біосенсора на основі ISFET та ELISA-методу. Аналіз на основі ISFET виконували двома способами: "конкурентним" і "донасичення". Перший спосіб був проведений у двох варіантах: а) коли специфічні IgG іммобілізували на поверхні затвора і патулін та його кон'югат з HRP конкурували за місця зв'язування; б) іммобілізований кон'югат патуліну з BSA конкурував за місця зв'язування з вільним токсином за сайти зв'язування специфічного IgG, міченого HRP. "Донасичення" виконували так: специфічні IgG було іммобілізовано на поверхні затвора і вони спочатку реагували з вільною формою патуліну, після цього взаємодіяли з кон'югатом патулін-HRP.

ELISA-метод проводили обома способами ("конкурентним" і "донасичення"), описаними для аналізу імунним біосенсором. Усі процедури для ELISA-методу виконували за стандартним протоколом, рекомендованим для аналізу мікотоксинів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Щоб установити оптимальну концентрацію кон'югату патуліну з HRP його рівень у подальших експериментах змінювали в межах $0,1-0,6 \mu\text{gml}^{-1}$ (з боку HRP). З'ясовано, що максимум виходу біосенсора (близько 98 мВ) відповідає $0,30 \mu\text{gml}^{-1}$ кон'югату. У цих умовах затвор ISFET був насичений сайтами зв'язування специфічних IgG. Коли специфічні IgG іммобілізували безпосередньою

взаємодією з радикалами GA на поверхні затвора рівень необхідного кон'югату патуліну з HRP був приблизно в 1,5 раза менший. Ймовірно, в цьому випадку деяка частина активних центрів IgG блокуються поверхнею. Саме тому, білок дозволяє антигену орієнтуватися на активні центри специфічних IgG і тим самим сприяє підвищенню рівня ферментів на поверхні. Це є ефективним способом для отримання більш високих сигналів.

Зміни ISFET потенціалу імунного біосенсора залежно від концентрації патуліну в модельних розчинах при виконанні аналізу "конкурентним" способом і "донасичення", проказані на рис. 2 (середні значення за 10 вимірів).

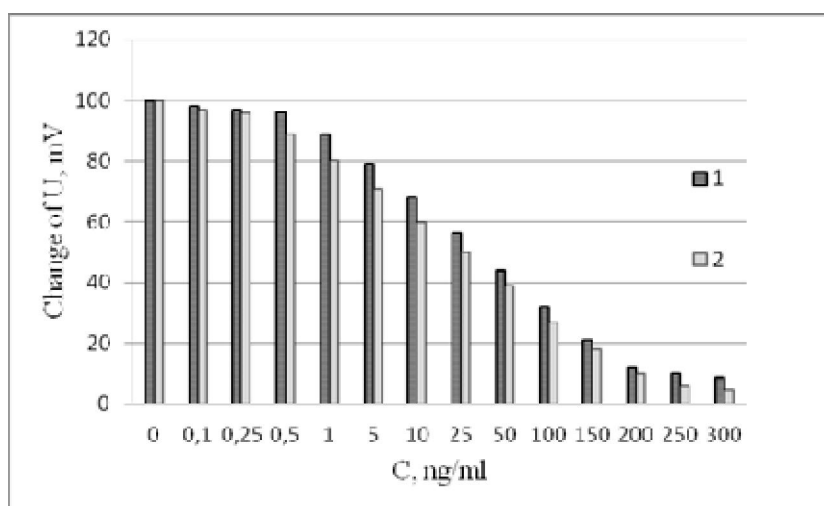


Рис.2 Потенціали імунного біосенсора на основі ISFET залежно від концентрації патуліну в модельних розчинах: 1- "конкурентний" (варіант а) і 2 – (варіант в) спосіб "донасичення"

Для обох способів виконання експерименту достовірно зниження сигналу біосенсора спостерігалось при $0,25 \text{ нг/мл}^{-1}$ патуліну в аналізованій суміші. Але в обох варіантах "конкурентного" способу аналізу лінійність зменшення сигналу спостерігалася при концентрації патуліну в діапазоні від $1,0$ до 200 нг/мл^{-1} (у цьому діапазоні потенціал затвора ISFET змінювався від 9 до 98 mV). Дещо вищу чутливість за трохи розширеного діапазону вимірюваних концентрацій (від $0,5$ до

250 нг / мл) було виявлено при способі «донасичення». Стандартне відхилення становило в середньому близько 5%.

Подібні відмінності щодо чутливості між досліджуваними способами і її підвищення при проведенні аналізу способом "донасичення" спостерігали і за виконання ELISA-методу. Найвища чутливість, досягнута за допомогою цього методу становила 5ng/ml (рис. 3).

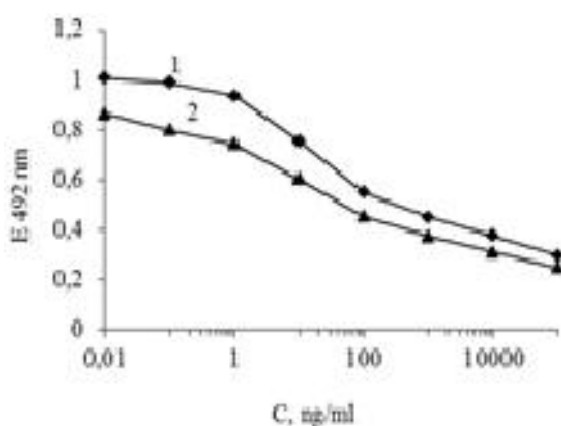


Рис. 3 Визначення вмісту патуліну в модельних розчинах за допомогою ELISA-методу: 1 - "конкурентний" і 2 - "донасичення" способи проведення аналізу.

Як видно, деякі відмінності в чутливості і діапазоні аналізу для двох різних способів за обох підходів (імунний біосенсор та ELISA-метод), можуть бути пов'язані з нерівномірною швидкістю дифузії вільного та кон'югованого патуліну.

Необхідно підкреслити, що ми не спостерігали будь-яких відмінностей у чутливості визначення патуліну в разі виконання обох варіантів "конкурентним" способом. Більше того, цей висновок справедливий для обох підходів аналізу: імунної біосенсорки і ELISA-методу.

Загальна тривалість аналізу, в тому числі й тривалість всіх етапів підготовки не перевищувала 30 хв, якщо специфічні IgG були попередньо іммобілізовані на затворі ISFET. Граничним його етапом є конкуренція між «вільним» і HRP-міченим патуліном за зв'язування з специфічним IgG, що досягає

максимального рівня протягом 20 хв. Якщо останній етап був скорочений до 10 або навіть 5 хв чутливість аналізу зменшувалась відповідно в 3 і в 10 разів. Таким чином, зменшення часу аналізу може призвести до зниження його чутливості.

У наших попередніх дослідженнях (дані не показані) було виявлено, що чутливість біосенсора може бути збільшена шляхом зменшення потужності WB, оскільки відповідно до існуючих даних [7] буферна ємність аналізованого зразка значно впливає на реакцію датчика. Нами проведено спеціальне дослідження залежності імунного сигналу біосенсора від потужності WB. Було проаналізовано рівень відгуку біосенсора за зміни цього індексу в межах від 1 до 20 mM. У таких експериментах під час оцінки оптимальної концентрації H₂O₂ кон'югат патуліну-HRP був пов'язаний з комплексом специфічні IgG - білок, попередньо іммобілізованим на поверхні датчика. Отримані результати показані на рис. 5.

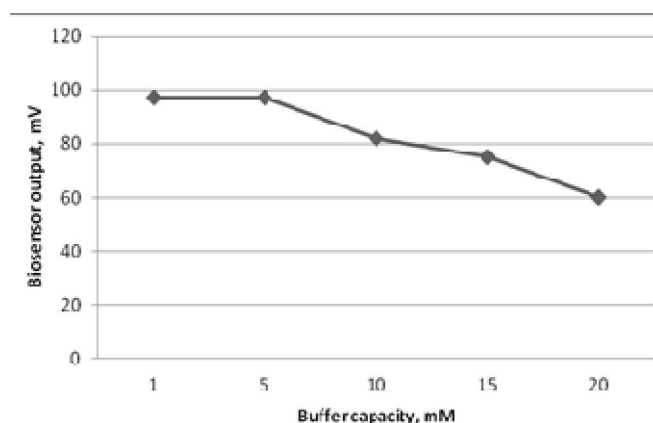


Рис. 5. Залежність відгуку імунного біосенсора від потужності WB.

Так, потужність WB, менша за 5 mM індукувала нестабільну реакцію, та зі збільшенням цього значення відгук імунного біосенсора знижувався, тому теке значення цього параметра має бути прийняте як оптимальне.

Руйнування зв'язків між комплексом антиген-антитіло шляхом обробки чіпів 0,1 M HCl протягом 5 хв дає можливість їх повторного використання для 2-3

вимірювань без зниження сигналу. В період між вимірами чіпи зберігали в сухому стані за температури 4° С. Перед кожним новим аналізом їх промивали в PBS протягом 2 годин.

Висновки.

1. Створено новий тип імунного біосенсора на основі ISFET для визначення патуліну та проведено два способи імуноаналізу – "конкурентний" і "донасичення".
2. Активність зв'язаної пероксидази вимірювали через реєстрацію основного зсуву рН розчину аскорбінової кислоти після додавання H₂O₂. Загальний час аналізу становив близько 30 хв.
3. Виконання дослідження першим способом дозволило виявляти патулін у концентраціях до 1,0 нг/мл⁻¹. Лінійність спостерігалася в діапазоні 5-200 ng/ml⁻¹. Застосування способу «донасичення» збільшує чутливість імунного біосенсора до 0,5 ng/ml⁻¹ з лінійністю в діапазоні 1.0-250 ng/ml⁻¹.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hajslova J., Zachariasova M., and Cajka T., Analysis of Multiple Mycotoxins in Food. J. Zweigenbaum (ed.). // Mass Spectrometry in Food Safety: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – 2011. – v. 747, doi 10.1007/978-1-61779-136-9_10.
2. Nabok A. V., Tzargorodskaya A., Mustafa M. K., [et al.]. Detections of low molecular weight toxins using an optical phase method of ellipsometry. // J. Sens. Actuators. – 2011. – В 154. – 232-237.
3. Llovera M., Viladrich R., Torres M. [et al.] Analysis of underivatized patulin by GC-MS technique. // J. Food Prot. – 1999. – 62(2). – 202–205.

4. Marek P., Annamalai T., and Venkitanarayanan K. // *Int. J. Food Microbiol.* 2003. – 89. – 139–144.
5. M. de Champdore, Bazzicalupo P, L. De Napoli, [et al.]. *Anal. Chem.* – 2007. – 79. – 751-757.
6. Rychlik M. and Schieberle P. // *J. Agric. Food Chem.* – 1999. – 47. – 3749–3755.
7. Starodub N. F. and Ogorodnijchuk J. O. Immune Biosensor Based on the ISFETs for the Express Determination of *Salmonella typhimurium*. // *Electroanalysis.* – 2012. – 24, 3. – 600-606.
8. Starodub N. F. and Starodub V. M. Biosensors based on porous silicon photoluminescence. // *Sensors Electronics and Microsystem Technol.* – 2004. – 2. – 63-83.
9. Starodub N.F. and Starodub V. N. // *Ukr. Biochim. J.* – 2002. – 74, 4. – 5-23.
10. Starodub N.F., Rachkov A. E, Petik A.V. [et al.] // *Proc. of Methods of Mol. Biol.* – 1986. – 90-99.
11. Starodub N. F., Dzantiev B. B., Starodub V. M. [et al.]. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor. // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – 424. – 37–43.
12. Starodub N. F., Pylypenko I.V., Pylypenko L. N. [et al.] Biosensors for the determination of mycotoxins: development, efficiency at the analysis of model samples and in case of the practical applications. // In book: “Lecture Notes of the ICB”. – 2010. – 86, 81. – 101.
13. Starodub N. F., Ogorodnijchuk Ju.O., N.F. Slisik. Biosensors for the control of some toxins, viral and microbial infections to prevent actions of bioterrorists. // In Proc.: “Portable Sensors for the Rapid Determination of Chemical and Biological Agents and other Weapons of Terrorism”, Ser. B – Physics and Biophysics. 2011.
14. Starodub N.F., Pylypenko L.N., Pylypenko I.V., [et. al] // *Timisoara Medical J.* – 2008. – 58, 1-2. – 9-18.

15. Starodub N.F., Kanju M.I., Ivashkevich S.P., [et al.] // Proc. of OPTO 2009&IRS2, Nuremberg. – 2009. – 151-156.
16. Songül Ü, Unuvar S., and Baydar T. Patulin: its toxicity and possible contamination of products used in baby nutrition. // Turk. Arch. Ped. – 2011. – 46. 266-270. doi: 10.4274/tpa.46.494

ИММУННЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ISFETs С ОКСИД ЦЕРИЕВОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТУЛИНА

Н. Ф. Слышик, Н. Ф. Стародуб

Представлены физико-химические и функциональные характеристики иммунного биосенсора на основе оксида церия ISFET. Пероксидаза хрена (HRP) служила меткой и ее активность замерялась через основной сдвиг pH раствора аскорбиновой кислоты в присутствии H_2O_2 . При анализе патулина "конкурентным" способом, определенная концентрация была до $1,0 \text{ ng/ml}^{-1}$ и линейность в рамках $5\text{-}200 \text{ ng/ml}^{-1}$. При "насыщении" чувствительность увеличивалась до $0,5 \text{ ng/ml}^{-1}$ с линейностью в диапазоне $1,0\text{-}250 \text{ ng/ml}^{-1}$.

Ключевые слова : *ISFET, оксид церит, иммунный биосенсор, патулин, определения*

THE IMMUNE BIOSENSOR BASED ON THE ISFETs CERIUM OXIDE SURFACE FOR THE PATULIN CONTROL

N. F. Slyshyk, N. F. Starodub

Physical-chemical and functional characteristics of the immune biosensor based on the cerium oxide ISFET will be presented. Horse radish peroxidase (HRP) was used as a label and its activity was measured by basic pH shift of ascorbic acid solution in the presence of H_2O_2 . At the patulin analysis by the "competitive" way the detecting concentrations was up to 1.0 ng ml^{-1} and linearity in frame of $5\text{-}200 \text{ ngml}^{-1}$. In case of the "saturation" way the sensitivity increased to 0.5 ngml^{-1} with the linearity in range of $1,0\text{-}250 \text{ ngml}^{-1}$.

Key words: *ISFET, cerium oxide, immune biosensor, patulin, determination*