

На правах рукописи

Глазырина Юлия Александровна

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ (*SALMONELLA THYPHIMURIUM*) С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Екатеринбург 2010

Работа выполнена на кафедре физики и химии

ГОУ ВПО «Уральский государственный экономический университет»

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: заслуженный деятель науки РФ,
доктор химических наук, профессор
Брайнина Хьена Залмановна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор химических наук, профессор
Майстренко Валерий Николаевич

доктор химических наук, профессор
Медянцева Эльвина Павловна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ГОУ ВПО «Московский государственный
открытый университет», г. Москва

Защита состоится 1 ноября 2010 года в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.285.09 при ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, зал ученого совета (И-420).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке УрФУ. С авторефератом можно ознакомиться на сайте УрФУ (www.ustu.ru).

Ваши отзывы в двух экземплярах, заверенные печатью организации, просим направлять по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», ученому секретарю университета.

Автореферат разослан: «_____» _____ 2010 года.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 212.285.09,
д.х.н., профессор

Ямщиков Л.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Сальмонеллез является одним из наиболее распространенных в развитых странах инфекционных заболеваний. Заболеваемость сальмонеллезом повсеместно имеет тенденцию к росту, особенно это касается крупных городов с централизованной системой продовольственного снабжения.

Диагноз сальмонеллеза традиционно подтверждается бактериологическими, серологическими (реакция агглютинации (РА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)) методами, а также иммуноферментным анализом (ИФА) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Недостатками этих методов являются: в ряде случаев низкая чувствительность и специфичность, поздние сроки подтверждения диагноза (РА, РНГА), высокая стоимость используемых реагентов (ИФА) и оборудования (ПЦР), необходимость создания специальных условий и длительность проведения анализа (бактериологический метод).

Объединение достижений и знаний в области нанотехнологий, толсто пленочной печати, органической, полимерной, аналитической химии, электрохимии и биохимии ведет к рождению новой генерации сенсоров и иммуносенсоров. Не в малой степени интерес к иммуносенсорам обусловлен уникальной специфичностью иммунореакции образования комплексов антител с антигенами или гаптенами.

Диссертация посвящена развитию новых подходов к созданию гибридного электрохимического метода иммуноанализа, включающего стадию магнитной сепарации наночастиц и интенсификацию процесса концентрирования определяемых компонентов в магнитном поле, для диагностики сальмонеллеза. Предлагается использовать магнитные наночастицы оксида металла (Fe_3O_4) в качестве детектируемой (электрохимической) сигналообразующей метки и магнитное концентрирование конъюгата на специальном твердом субстрате.

Работа является частью исследований, проводимых на кафедре физики и химии Уральского государственного экономического университета в рамках

заданий Министерства промышленности и науки Свердловской области «Нанотехнологии в био- и химических сенсорах для мониторинга окружающей среды и здоровья человека». Исследования выполнены при поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ, грант «Разработка электрохимических биосенсоров с использованием наноструктурированных материалов на основе углеродсодержащих соединений» (2006-2008 гг. Выполненные исследования соответствуют приоритетному направлению развития науки, технологии и техники "03. Индустрия наносистем и материалов" и критической технологии РФ "07. Нанотехнологии и наноматериалы" (Пр-842 от 21.06.2006).

Цель работы Создание нового гибридного электрохимического метода иммуноанализа для определения патогенных микроорганизмов, основанного на применении магнитных наночастиц для магнитной сепарации и концентрирования конъюгатов микроорганизм – наночастицы на поверхности твердофазной подложки.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- осуществить синтез наночастиц с воспроизводимыми целевыми характеристиками;
- исследовать структуру полученных наночастиц, их физико-химические свойства и динамику изменения размера агрегатов в водной суспензии;
- выбрать условия и способы иммобилизации наночастиц на/в поверхности/объеме клетки;
- выбрать рабочие условия формирования иммунокомплекса антиген (патогенный микроорганизм - сальмонелла) – антитело;
- найти условия формирования электрического сигнала;
- сравнить результаты анализа инфицированных сальмонеллезом проб, полученные с использованием предложенного подхода и традиционных методов;

- показать возможность расширения предложенного подхода для других видов микроорганизмов.

Научная новизна работы. Впервые в качестве метки в электрохимическом иммуноанализе использованы магнитные наночастицы оксида переходного металла Fe_3O_4 .

Впервые проведено комплексное исследование процессов агрегации наночастиц Fe_3O_4 в зависимости от их концентрации в водной суспензии. Показано, что накопление наночастиц на/в клетке и их электрохимическая активность зависит от природы клеток. Влияние наночастиц Fe_3O_4 на жизнеспособность клеточных культур на примере их взаимодействия с культурой клеток L41 (онкогенная клеточная линия человека (кровь больного лейкемией)), клетками эмбрионального легкого человека, трансформированного вирусом SV-40 (клетки WI-38), микроорганизмами *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* не значительно.

Получены зависимости количества поглощенных клетками наночастиц от времени их взаимодействия. Показана взаимосвязь электрохимического отклика с количеством наночастиц, содержащихся в иммунокомплексе и концентрацией искомых возбудителей в растворе.

Предложен новый гибридный вариант иммуноанализа, включающий:

- стадию магнитной сепарации, что позволило осуществить отделение несвязанных наночастиц;
- стадию магнитного концентрирования, что позволило сократить время анализа и увеличить его чувствительность.

Практическая значимость работы. Предложен алгоритм реализации гибридного иммуноэлектрохимического метода диагностики сальмонеллеза.

Предложенный алгоритм гибридного иммуноэлектрохимического метода анализа отличается от известных исключением:

- применения нестабильных ферментов и дорогостоящего оборудования;
- введения в анализируемый раствор специальных субстратов, обеспечивающих протекание сигналообразующей реакции;

- необходимости создания специальных условий для проведения анализа.

Метод обеспечивает возможность подтверждения диагноза в ранние сроки заболевания.

Предложено использование бактериального антигена для определения патогенных микроорганизмов, позволяющее увеличить чувствительность анализа.

Предложенный метод анализа обеспечивает предел обнаружения 8.18 КОЕ/см³ для бактерии и антигена 1.51×10^{-6} мг/см³ *S.thyphimurium*, что соответствует характеристикам ПЦР анализа.

Простота и экономическая эффективность метода позволяет организовать иммуноанализ на месте в небольших клиниках.

На основе результатов работы получен патент РФ № 2397243 от 20.08.2010.

Проведены испытания предложенного иммуноэлектрохимического метода количественного определения *S.thyphimurium* в сравнении с традиционно используемыми методами - ПЦР анализа и бактериального посева в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск. Получен акт испытаний, подтверждающий возможность использования предложенного электрохимического способа иммуноанализа для диагностики патогенных микроорганизмов.

Результаты диссертационной работы использованы ФГУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора при выполнении Федеральной целевой программы "Развитие инфраструктуры nanoиндустрии в Российской Федерации на 2008 - 2010 годы" для разработки нормативно-методического обеспечения и средств контроля содержания наночастиц на объектах производственной сферы.

На защиту выносятся:

- результаты экспериментальных исследований структуры, размерного состава наночастиц Fe₃O₄, синтезированных различными методами,

полученные с помощью измерения дифракции и электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМ). Выбор оптимального способа получения стабильных в суспензии наночастиц с узким распределением по размерам, определенной формы, состава, структуры;

- результаты исследования взаимодействия наночастиц Fe_3O_4 с различными культурами клеток с целью выбора оптимальных условий их взаимодействия;

- способ количественного определения патогенных микроорганизмов, основанный на формировании иммунокомплексов с участием меченых магнитными наночастицами бактерий (антигенов) и отличающийся повышенной чувствительностью и сокращенным временем анализа;

- алгоритмы количественного определения бактерий *S.typhimurium*, *Escherichia coli*;

- результаты анализа фекальных масс животных, инфицированных *S.typhimurium*, подтвержденные данными независимого стандартного бактериологического метода.

Апробация работы. Результаты исследований представлены на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, Россия 2007 г.), на Международном семинаре-ярмарке «Российские технологии для индустрии» «Нанотехнологии в электронике, энергетике, экологии и медицине» (Санкт-Петербург, Россия, 2007 г.), на VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «Электрохимические методы анализа (ЭМА-2008)» (Уфа, Россия, 2008 г.), на Третьей Всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2009» (Екатеринбург, Россия, 2009 г.), на выставке-ярмарке продукции и технологий промышленных предприятий и научных организаций Свердловской области «Нанотехнологии 2009» (Екатеринбург, Россия, 2009 г.), на 9 Семинаре «(Био)сенсоры и биоаналитические микротехнологии для защиты окружающей среды и клинического анализа» (Монреаль, Канада, 2009 г.), на III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России» (Краснодар, Россия, 2009 г.), на научно-практической конференции

«Нанотехнологии – производству» (Екатеринбург, Россия, 2009 г.), Съезде аналитиков России (Москва (пансионат «Клязьма») 2010 г.), на Симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии» (Томск, Россия, 2010 г.).

Публикации. По содержанию диссертационной работы опубликовано 18 работ, в том числе 1 патент РФ, 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 глава в монографии, тезисы 13 докладов на всероссийских и международных конференциях.

Личное участие автора состоит в решении основных задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке, интерпретации и систематизации результатов исследования.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, включая 16 таблиц, 49 рисунков и состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы из 150 наименований и 3 приложений.

Во ***Введении*** раскрыта актуальность темы исследования, определены цели и задачи, сформулированы научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту. В ***Литературном обзоре (глава 1)*** рассмотрены основные направления создания биосенсоров, показана актуальность использования наноматериалов в их составе. В ***Экспериментальной части (глава 2)*** представлены данные об объектах исследования, используемых методах и измерительном оборудовании, приведены условия эксперимента. ***Глава 3*** посвящена выбору метода синтеза магнитных наночастиц Fe₃O₄. В ***главе 4*** приведены результаты исследования взаимодействия наночастиц Fe₃O₄ с различными видами клеточных культур: культура клеток L41 (онкогенная клеточная линия человека (кровь больного лейкемией)), клетки эмбрионального легкого человека, трансформированного вирусом SV-40 (клетки WI-38), микроорганизмы *S. typhimurium*, *S.aureus* - с целью выбора оптимальных условий их взаимодействия. ***Глава 5*** посвящена разработке электрохимического метода определения патогенных микроорганизмов *S. typhimurium* с использованием магнитных наночастиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

АППАРАТУРА И РЕАКТИВЫ

Для проведения электрохимических исследований использовали инверсионный вольтамперометрический анализатор "ИВА-5" (НПВП "ИВА", г. Екатеринбург, Россия).

Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку объемом 10 см³. Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный стержень, электродом сравнения - хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl / 3 моль/дм³ KCl) ЭВЛ – 1М (г. Гомель, Беларусь). В качестве рабочего электрода использовали толсто пленочный планарный электрод на основе графитсодержащих чернил «Metech» (США), модифицированный каломелью (ТМГЭ), изготовленный методом трафаретной печати (НПВП "ИВА", г. Екатеринбург).

Иммобилизацию антител проводили на подложке, в качестве которой использовали толсто пленочный эпоксиграфитовый электрод (ТГЭ), изготовленный на основе графитоэпоксидной пасты методом трафаретной печати (НПВП "ИВА", г. Екатеринбург).

В работе использовали рН-метр-милливольтметр типа рН-150, спектрофотометр марки «LEKI SS1103» («MEDIORA OY», Финляндия) со стеклянной кюветой толщиной 1 см. Исследования методом динамического рассеяния света проводили на универсальном анализаторе суспензий Brookhaven ZetaPlus.

Для магнитной сепарации наночастиц Fe₃O₄ применяли магнитный штатив «MagneSphere®» для 6 микропробирок «EppendorfT» («Promega», США) с напряженностью магнитного поля 31.83×10³ А/м. Для магнитного концентрирования использовали магнит, сконструированный в институте физики металлов УрО РАН, с величиной магнитного поля 37.40×10⁴ А/м.

Микроскопические исследования проводили с использованием растрового сканирующего электронного микроскопа «Quanta-200» («FEI Company», США) и просвечивающих электронных микроскопов «JEM-1400» («Jeol», Япония), «FEI MORGAGNI 286(D)» («FEI Company», США).

Фотосъемку проводили на цифровую камеру «VELETA» (SIS, «Olympus», Германия) и на встроенные камеры микроскопов.

Применяли реактивы квалификации "ос.ч." или "х.ч.". Все растворы готовили на деионизированной воде.

S.typhimurium штамм SL 7207 (2337-65 (=WRAY) hisG46 DEL407 [aroA544::Tn10]), *S.aureus*, *E.coli* штамм ATCC 25922 (*E.coli*), антиген и гипериммунная сыворотка к микроорганизму *S.typhimurium* (10^8 КОЕ/мл) предоставлены ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск.

1. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ Fe_3O_4

Наночастицы оксидов железа обычно получают, используя реакцию солей в щелочной среде (метод соосаждения):



С целью повышения монодисперсности получаемых наночастиц был использован альтернативный метод синтеза наночастиц в обратных мицеллах. Этим методом наночастицы получали в присутствии поверхностно-активного вещества (ПАВ) - цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) или с использованием в качестве ПАВ - (бис-2-этилгексил)сульфосукцинат натрия (Na(AOT)).

Размер и форму полученных наночастиц Fe_3O_4 исследовали методом ПЭМ. Согласно данным ПЭМ, наночастицы Fe_3O_4 имеют сфероидную форму независимо от метода синтеза.

Методом соосаждения по реакции (1) получены наночастицы, имеющие достаточно узкое размерное распределение (рис.1) с максимумом около 10 нм. На долю частиц с диаметром более 50 нм приходится всего 8.9% от общего их числа.

Синтез в обратных мицеллах с использованием ЦТАБ обеспечивает получение наночастиц, имеющих размер в диапазоне от 40 до 50 нм (рис.1б). На диаграмме распределения (рис.1г) наночастиц, полученных таким способом,

максимум распределения частиц приходится на 50 нм при узком распределении по линейным размерам вокруг этого максимума.

В мицеллах, образованных в присутствии Na(AOT), получены магнитные наночастицы размером 10-20 нм.

Согласно рентгенографическим исследованиям и данным электронной дифракции все синтезированные наночастицы соответствуют составу Fe_3O_4 . Магнитная восприимчивость синтезированных наноматериалов, определенная методом Фарадея составила $82 \text{ см}^3/\text{г}$.

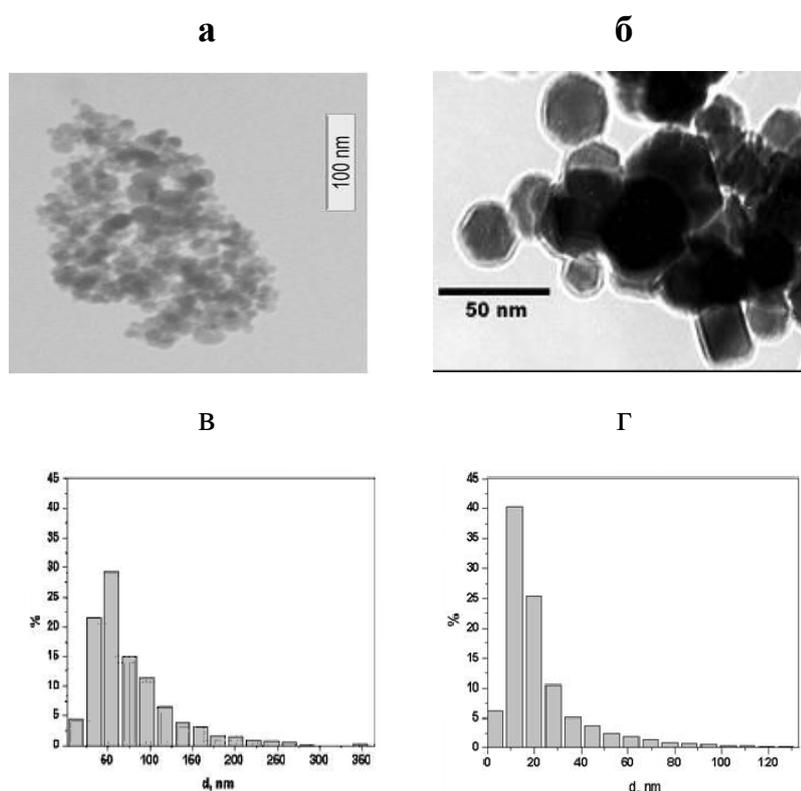


Рисунок 1 –

Микрофотографии (а, б) и гистограммы распределения по размерам (в, г) наночастиц Fe_3O_4 .

а, в – наночастицы Fe_3O_4 , полученные методом соосаждения, б, г - наночастицы Fe_3O_4 , полученные методом синтеза в обратных мицеллах (ПАВ – ЦТАБ).

При выборе метода синтеза наночастиц мы учли представленные выше результаты, а также следующие недостатки метода синтеза в обратных мицеллах:

- длительность и трудоемкость процесса синтеза и отмывки (раствор промывают и обрабатывают для удаления побочных продуктов);
- полученное в результате синтеза гидроксидное соединение необходимо нагреванием переводить в нанокристаллический оксид.

Таким образом, применение более технологически сложного метода синтеза наночастиц в обратных мицеллах не дало ощутимых преимуществ по

сравнению с методом соосаждения, поэтому в дальнейших экспериментах был использован наименее трудоемкий метод соосаждения.

Для изучения кинетики агрегации синтезированных нанодисперсных систем Fe_3O_4 использовали метод визуального наблюдения и метод динамического рассеяния света.

Выбор относительно устойчивой суспензии производили путем последовательного разбавления суспензии наночастиц 5 г/дм^3 и визуальным фиксированием образования осадка. Оптимальным разбавлением, при котором достаточное количество наночастиц равномерно распределены в объеме раствора, является разбавление до концентрации 0.125 г/дм^3 .

Выполнены измерения размера частиц в суспензии с концентрацией Fe_3O_4 0.125 г/дм^3 в последовательные моменты времени (через 10 с, 1 час, 24 час после УЗ обработки). Данные, полученные методом динамического рассеяния света, показывают, что в изучаемой суспензии наблюдались агрегаты размером до 500 нм. Ультразвуковая обработка (УЗ) эффективно дезагрегирует систему, которая остается стабильной в течение 24 час после проведенной УЗ обработки в течение 10 с, т.к. регистрируемый средний размер агрегатов (70.7 нм) частиц в суспензии не изменяется.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ Fe_3O_4 С РАЗЛИЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК

Исследовали воздействие наночастиц Fe_3O_4 , полученных методом соосаждения, на клетки L41 (онкогенная клеточная линия человека (кровь больного лейкемией)), клетки эмбрионального легкого человека, трансформированного вирусом SV-40 (клетки WI-38), а также микроорганизмы *S.thyphimurium*, *S.aureus*.

Наночастицы Fe_3O_4 вводили в питательную среду в виде суспензии в деионизированной воде. Суспензию наночастиц в питательной среде (15 см^3) в начальной цитотоксичной концентрации, которая, согласно литературным данным, для наночастиц оксида железа составляет 1000 мкг/см^3 , вводили в исследуемую культуру клеток. Клеточные культуры инкубировали с

наночастицами при температуре $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ в течение определенного времени, после этого удаляли среду, содержащую наночастицы, и заменяли ее на свежую, свободную от наночастиц. Затем культуру клеток с сорбированными наночастицами анализировали.

2.1. Результаты электронно-микроскопического исследования

На полученных микрофотографиях клеток L41 с наночастицами после 24 час инкубации видны темные области клеточных скоплений и более светлые области Fe_3O_4 , свидетельствующие об адсорбции наночастиц на поверхности клеток. При большем увеличении (в 10000) поверхности клетки можно увидеть неравномерное поглощение наночастиц клеткой, что не наблюдается на поверхности раковой клетки без наночастиц.

На рис.2 представлены микрофотографии клеток WI-38 без наночастиц (рис. 2а) и с наночастицами магнетита после 24 час инкубации (рис. 2б).

На микрофотографии (рис. 2б) видны клетки, клеточные органеллы и более темные области (оптически более плотные) наночастиц.

С увеличением времени инкубации клеток с наночастицами наблюдается интенсивное поглощение магнетита клетками. Введенные наночастицы локализуются в цитозоле и субклеточных структурах клетки.

Далее приведены электронные микрофотографии клеток *S. typhimurium* и *S. aureus* после инкубации с наночастицами Fe_3O_4 . Клетки сальмонеллы имеют палочковидную форму. На микрофотографиях клеток после инкубации четко наблюдается темная область наночастиц на клетке, что свидетельствует об их адсорбции (рис. 2в). Клетки *S.aureus* после инкубации с наночастицами Fe_3O_4 имели обычную для этого рода клеток структуру, поврежденные клетки были единичны. Агрегаты наночастиц наблюдались, в основном, на значительном удалении от клеток, крайне редко регистрировался близкий контакт (рис.2г). В целом можно заключить, что наночастицы не взаимодействуют с клетками *S.aureus* в течение выбранного для исследования времени взаимодействия наночастиц с клетками *S.typhimurium*.

Вероятно, это связано с принципиальными различиями в строении поверхностных структур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

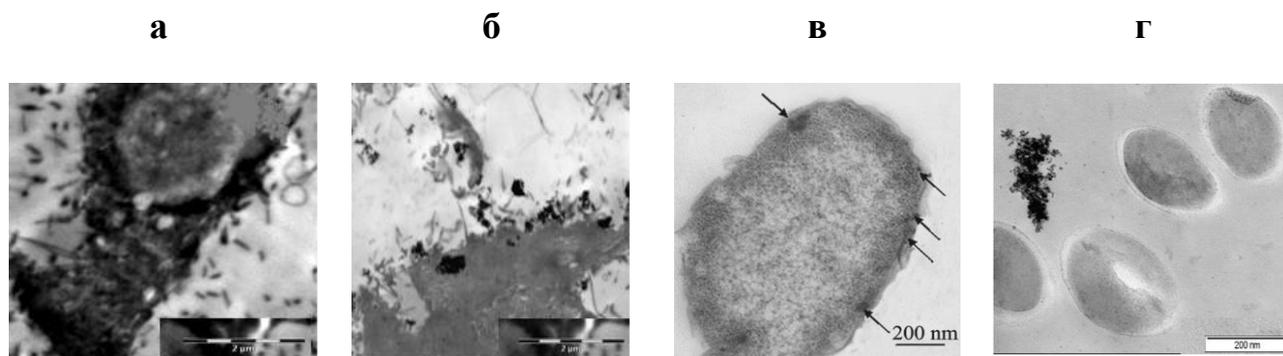


Рисунок 2 - Микрофотографии клеток WI-38 (а, б) и клеток *S.typhimurium* (в) после инкубирования с наночастицами Fe_3O_4 : а - клетки WI-38 без наночастиц, б - клетки WI-38 после инкубации с наночастицами в течение 24 час, в, г - клетки *S.typhimurium* и *S.aureus* после 1 час инкубирования с наночастицами Fe_3O_4 соответственно. Просвечивающий электронный микроскоп «FEI MORGAGNI 286(D)» («FEI Company», США). Просвечивающий электронный микроскоп «Jem 1400» («Jeol», Япония) для клеток *S.typhimurium* и *S.aureus*.

2.2. Жизнеспособность клеточных культур при воздействии наночастиц

Оценку вредного воздействия наночастиц магнетита на клетки WI-38 и культуры *S.typhimurium* осуществляли с использованием красителя трипанового синего и методом бактериального посева соответственно. Наблюдалось незначительное увеличение доли погибших клеток в образце с наночастицами по сравнению с контрольным образцом.

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют о низкой токсичности наночастиц Fe_3O_4 , что обуславливает возможность использования наночастиц Fe_3O_4 в качестве метки в разрабатываемом методе электрохимического иммуноанализа для определения бактерий сальмонеллы.

2.3. Определение количества наночастиц, поглощенных клетками

Для количественного определения магнетита в клеточной культуре *S.typhimurium* была адаптирована методика определения железа методом

инверсионной вольтамперометрии (ИВ), аттестованная для анализа вод, основанная на адсорбционном концентрировании поверхностно активного комплекса железа (III) – пирокатехин на толсто пленочном графитсодержащем электроде, модифицированном Hg_2Cl_2 . Наночастицы Fe_3O_4 в клеточной культуре переводили в форму Fe (III) путем растворения конъюгата наночастиц с клетками в смеси азотной и серной кислот с последующим кипячением. Выполнение измерений и условия ИВ анализа были аналогичны предусмотренным в аттестованной методике. Метод позволяет определять 0,0005 – 1 мг железа (III) в 1 дм^3 раствора.

Для определения железа в клеточных культурах WI-38 кроме ИВ метода также использовали метод фотометрии (ФМ) в случае если концентрация железа в пробе превышает 1 мг/дм^3 . Оксид железа в пробе окислением переводили в форму Fe (III) (подготовка проб биоматериала к фотометрическим измерениям аналогична таковой в электрохимическом методе анализа), которая в кислой среде реагирует с роданид-ионами с образованием комплексного соединения красного цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации железа в интервале 0.05 – 4.0 мг/см^3 . Максимум поглощения продукта реакции находится при $\lambda = 500$ нм. Массовую концентрацию элемента в растворе определяли по калибровочному графику.

Правильность обоих разработанных способов анализа конъюгатов клеток с наночастицами на содержание железа подтверждена анализом стандартного образца бычьей печени. Результаты анализа стандартного образца, полученные с использованием ФМ и ИВ анализа, попадают в область аттестованных содержаний железа в стандартном образце.

В табл. 1 представлены результаты, количественно характеризующие сорбцию наночастиц магнетита различными культурами клеток. Полученные данные показали возможность использования метода ИВ и наноструктурированного Fe_3O_4 в качестве метки для определения патогенных микроорганизмов.

Таблица 1 - Результаты ИВ и ФМ определений содержания железа в минерализате конъюгатов клеток с наночастицами Fe₃O₄ (n=5, P = 0.95)

Культуры клеток	Концентрация наночастиц Fe ₃ O ₄ , мкг/см ³	Время инкубации, ч	Найдено железа, мкг/г	
			методом ИВ анализа	методом ФМ
<i>S.typhimurium</i>	контроль*		20±4	-
	125	1	332 ±15	-
клетки L41	контроль		-	90±7
	1000	24	-	1607± 21
клетки WI-38	контроль		-	12±2
	1000	24	-	1700±56
Стандартный образец бычьей печени SRM 1577a, содержащий 194 ± 20 мкг/г железа			176 ± 3	171 ± 19

*контроль – клеточные культуры без наночастиц.

3. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ Fe₃O₄ В ГИБРИДНОМ ИММУНОАНАЛИЗЕ

Исследована возможность использования наночастиц Fe₃O₄ в качестве детектируемой (электрохимической) метки, и в магнитном концентрировании для определения бактериальных клеток *S.typhimurium* и соответствующего бактериального антигена.

Процедура предлагаемого варианта метода иммуноанализа включала стадии подготовки подложки (ТГЭ), получения конъюгата наночастиц с микроорганизмами или антигеном, формирования иммунокомплекса, растворение иммунокомплекса и детектирование сигнала методом ИВ.

На первой стадии на поверхность подложки наносили 10 мм³ сыворотки крови морской свинки, содержащей антитела к бактерии *S.typhimurium* и высушивали при температуре (37.0±0.1)°С.

На второй стадии 0.25 см³ водной суспензии наночастиц Fe₃O₄ (0.125 г/дм³) добавляли непосредственно к исследуемому образцу (объемом 0.5 см³), содержащему микроорганизм либо антиген бактерии *S.typhimurium*, и инкубировали при температуре (37.0±0.1)°С. Затем отделяли свободные наночастицы с помощью магнита (рис.3).

На третьей стадии подложку с иммобилизованными антителами помещали в среду, содержащую конъюгат наночастиц с микроорганизмами либо антигеном, и инкубировали следующими способами:

1. в течение 30 мин при температуре (37.0±0.1)°С;
2. в течение 15 мин при температуре (37.0±0.1)°С в присутствии магнитного поля.

магнитного поля.

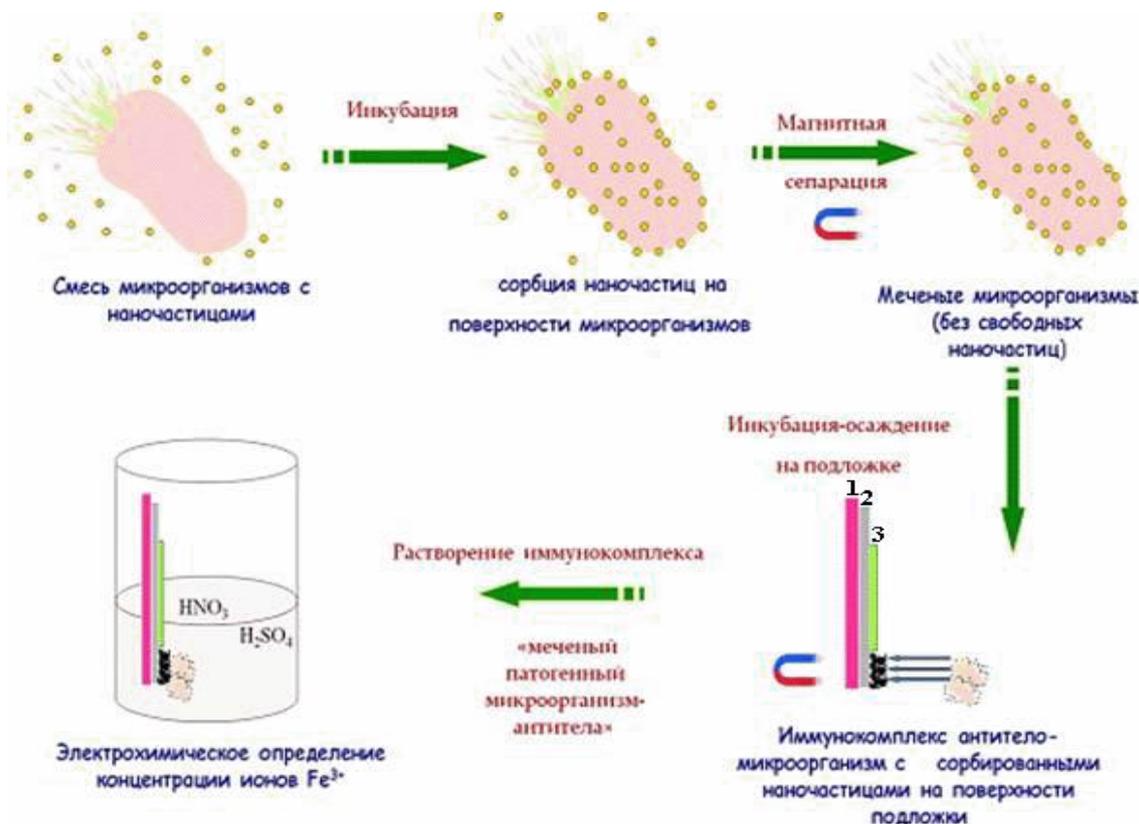


Рисунок 3 – Схема электрохимического иммуноанализа (1 – полимерная пластина, 2 – слой графитоэпоксидной пасты, 3 – слой изолятора).

Пробы для электрохимического определения Fe (III) готовили кислотным разложением иммунокомплекса в смеси 0.36 моль/дм³ серной и 0.28 моль/дм³ азотной кислот при нагревании до 90°С в течение 1-2 час. Для этого подложку опускали в стеклянный стаканчик со смесью кислот, таким образом, чтобы зона, на которой формировался иммунокомплекс, была полностью погружена в раствор, и выдерживали в течение 15 мин.

Полученный раствор кипятили до получения сухого остатка. Затем остаток растворяли в 1.5 см³ деионизированной воды. Раствор помещали в электрохимическую ячейку, содержащую 0.1 моль/дм³ ацетата натрия и 0.5 ммоль/дм³ пирокатехина. Концентрацию железа определяли по известной методике методом ИВ.

Результаты, полученные при анализе растворов, не содержащих и содержащих микроорганизмы либо антиген бактерии *S.typhimurium* подтверждают, что величина производной тока восстановления ионов железа (III) от потенциала (dI/dE) может служить источником информации о количестве бактерий/антигена, меченных наночастицами Fe₃O₄, локализованных на поверхности подложки (рис. 4). Растворы получены после кислотной обработки подложки.

Для выбора оптимального времени формирования конъюгата наночастиц с микроорганизмами была исследована зависимость величины dI/dE, полученной после кислотной обработки конъюгата, от времени образования конъюгата.

Кривая выходит на насыщение при времени инкубации, превышающем 30 мин. В связи с этим в дальнейших исследованиях образование конъюгата бактерий с наночастицами проводили в течение 30 мин. Было изучено влияние магнитного поля на кинетику процесса концентрирования конъюгата на поверхности подложки и получены данные зависимости dI/dE от времени (t) формирования иммунокомплекса на подложке, за которой был помещён магнит. В отличие от первого случая (концентрирование без использования магнитного поля) зависимость dI/dE-t выходит на насыщение при времени инкубации превышающем 15 мин, что связано с ускорением подвода

конъюгатов к поверхности подложки под действием магнитного поля. Этот эффект сокращает время анализа. В дальнейших исследованиях проводили стадию концентрирования конъюгата бактерия/антиген - наночастицы Fe_3O_4 на поверхности подложки в магнитном поле в течение 15 мин.

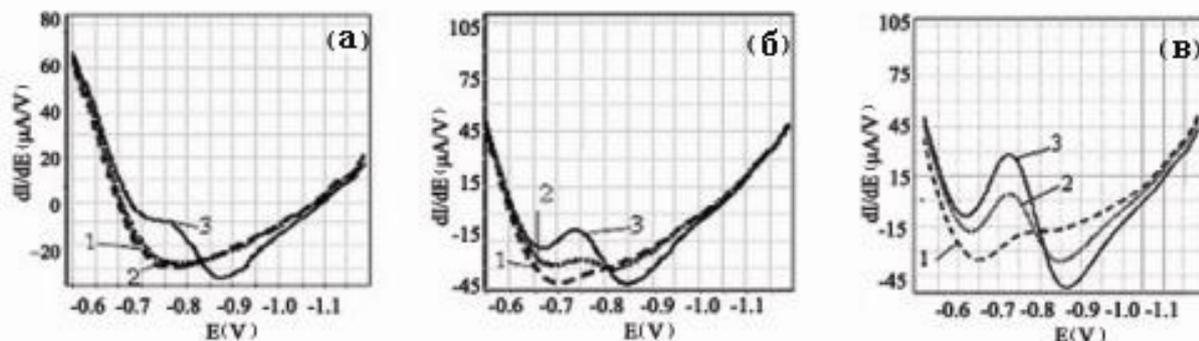


Рисунок 4 - Производные вольтамперограммы железа, полученные при анализе растворов, не содержащих (а) и содержащих (б) микроорганизмы, либо антиген бактерии *S.typhimurium* (в). (1) – фон, (2) – проба, (3) - проба со стандартной добавкой аттестованного раствора Fe (III). Условия определения: фон 0.1 моль/дм³ ацетата натрия (рН 7.5), содержащий 0.5 ммоль/дм³ пирокатехина. $E_s=0.1$ В, $\tau_s=60$ с, $\nu=0.5$ В/с

Наблюдаются линейные зависимости логарифма dI/dE от логарифма концентрации бактерий ($\lg(dI/dE)=0.0818\lg C - 0.476$; $R=0.995$) и антигена *S.typhimurium* ($\lg(dI/dE)=0.102\lg C + 0.6237$; $R=0.994$) в интервале концентраций ($10^3 - 10^8$) КОЕ/см³ и ($10^2 - 10^8$) КОЕ/см³ ($10^{-6} - 1$) мг/см³ соответственно.

Предел обнаружения составляет 8.18 КОЕ/см³ и 1.51×10^{-6} мг/см³ (1.51 КОЕ/см³) для бактерии и антигена *S.typhimurium* соответственно.

В таблице 2 приведены результаты, полученные при анализе модельных растворов, содержащих микроорганизм *S.typhimurium*, методами ПЦР*, бактериальным посевом и разработанным электрохимическим методом.

Из полученных результатов видно, что минимальная концентрация, определяемая электрохимическим методом составляет 10^2 (для антигена *S.typhimurium*) и 10^3 КОЕ/см³ (для бактерии *S.typhimurium*), что совпадает с

* Благодарим сотрудников ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск) за проведение ПЦР анализа и бактериального посева.

характеристиками ПЦР анализа. Однако в случае электрохимического иммуноанализа не требуется применение дорогостоящего оборудования, реагентов и сокращается время анализа.

Таблица 2 - Сравнительные результаты тестирования проб, содержащих *S.typhimurium* различными методами

Концентрация, КОЕ/см ³	Бактериальный посев	ПЦР	Электрохимический метод n=3, P=0.95	
			Антиген <i>S.typhimurium</i>	<i>S.typhimurium</i>
10 ⁶	обнаружено	обнаружено	9.3 × 10 ⁵	8,5 × 10 ⁵
10 ⁵	обнаружено	обнаружено	1.1 × 10 ⁵	9.5 × 10 ⁴
10 ⁴	обнаружено	обнаружено	0.8 × 10 ⁴	9.9 × 10 ³
10 ³	обнаружено	обнаружено	930	1000
10 ²	не обнаружено	обнаружено	97	не обнаружено
10 ¹	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
0	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено

Для исследования специфичности разрабатываемого метода подложку с иммобилизованными антителами к бактерии *S.typhimurium* инкубировали в двух растворах, один из которых содержал микроорганизмы *E. coli* (штамм АТСС 25922), а другой *S.typhimurium*.

При инкубации в растворе, не содержащем *S.typhimurium*, откликов не наблюдалось, поскольку иммунокомплекс на поверхности подложки не формировался, что показывает отсутствие влияния неспецифических взаимодействий и адсорбции.

Результаты, полученные при анализе образцов испражнений инфицированных животных (курица), на наличие микроорганизмов *S.typhimurium* удовлетворительно согласуются с результатами, полученными с

использованием метода бактериального посева (электрохимический метод - $6.8 \pm 0.3 \lg \text{КОЕ}/\text{см}^3$, метод бактериального посева - $7.0 \lg \text{КОЕ}/\text{см}^3$).

Для иллюстрации возможности развитого подхода для определения других микроорганизмов с использованием других антител исследовали систему *E. coli* – антитела. Для этого на подложку иммобилизовали поликлональные антитела к *E. coli* описанным ранее способом и далее использовали разработанный метод для определения микроорганизмов *E. coli*. Условия анализа были аналогичны найденным для системы микроорганизмов *S.typhimurium*. Полученные производные вольтамперограмм железа при анализе растворов не содержащих и содержащих микроорганизмы *E.coli* аналогичны ранее представленным (рис. 4, стр.19).

Была получена линейная зависимость логарифма dI/dE от логарифма концентрации бактерий *E. coli* ($\lg(dI/dE)=1.0313\lg C - 5.4888$; $R=0.997$) в диапазоне ($10^4 - 10^7$) $\text{КОЕ}/\text{см}^3$. Приведенные данные свидетельствуют о том, что предложенный метод является достаточно общим и в будущем может быть использован для других микроорганизмов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ размерного состава наночастиц Fe_3O_4 полученных в различных условиях (соосаждение, использование ПАВ) показал возможность получения суспензий с узким размерным составом с максимумом при 50 и 10 нм. Комплексом физических методов (измерение электронной дифракции, ПЭМ, динамическое светорассеяние) подтверждена ожидаемая химическая структура наночастиц, а также дана оценка их агрегативной устойчивости. Выбраны условия получения наночастиц, позволившие получить высокоустойчивые суспензии, не склонные к агрегации в течение, по крайней мере 24 час и имеющие максимальную долю частиц с линейными размерами около 10 нм.
2. Показано, что взаимодействие наночастиц Fe_3O_4 с клетками микроорганизмов и тканей человека зависит от природы клеток.

Наблюдается накопление наночастиц как на поверхности клеток, так и в цитозоле и субклеточных структурах клетки. Характер взаимодействия, как и структура полученных агрегатов, определяются природой клеток и связаны, по-видимому, с особенностями строения клеточной мембраны.

3. Исследования цитотоксичности полученных наночастиц Fe_3O_4 по отношению к различным культурам клеток показали их низкую активность, что позволило использовать суспензии наночастиц в иммунохимических экспериментах.
4. Разработан новый вариант электрохимического определения *S. thyphimurium* SL 7207, основанный на их взаимодействии с наночастицами Fe_3O_4 с последующей магнитной сепарацией несвязанных наночастиц и магнитным концентрированием образующегося конъюгата и определением его концентрации. В качестве источника информации использована концентрация ионов железа, найденная методом ИВ, в растворе образующемся после кислотного разложения иммунокомплексов. Способ позволяет достичь предела обнаружения 8.18 КОЕ/см^3 и $1.51 \times 10^{-6} \text{ мг/см}^3$ (1.51 КОЕ /см^3) для бактерий и бактериального антигена, соответственно. Надежность и правильность результатов электрохимического иммуноанализа подтверждены результатами, полученными на модельных и реальных объектах, а также путем сравнения с традиционными вариантами бактериального анализа.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Брайнина Х.З. Способ определения патогенных микроорганизмов [Текст] / Х.З. Брайнина, А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, М.Я. Ходос. // Патент РФ № 2397243. - Бюл.№23. - 20.08.2010.
2. Брайнина Х.З. Наноматериалы: риски и использование in vivo и in vitro в диагностике [Текст] / Х.З. Брайнина, А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, Л.В. Устинов // Химический анализ в медицинской диагностике. - Под ред. Г.К. Будникова. - М.: Наука. - 2010. – Т. 11. - С. 164-178.
3. Katsnelson B. Some Peculiarities of Pulmonary Clearance Mechanisms in rats after Intratracheal Instillation of Magnetite (Fe_3O_4) Suspensions with Different Particle Sizes in Nanometer and Micrometer Ranges: Are We Defenseless against

- Nanoparticles? [Text] /, B. Katsnelson, L.I. Privalova, S.V. Kuzmin, T.D Degtyareva, M.P. Sutunkova, O.S. Yeremenko, I.A. Minigalieva, E.P. Kireyeva, M.Y. Khodos, A.N. Kositsina, N.A. Malakhova, Y.A. Glazyrina, V.Y. Shur, E.I. Shishkin, E.V. Nikolaeva // J. OCCUP. ENVIRON. HEALTH.– 2010.– V. 16, №4. – P. 503-519.
4. Brainina Kh. Z. Hybrid electrochemical/ magnetic assay for *Salmonella Typhimurium* detection [Text] / Kh. Z. Brainina, A. N. Kozitsina, Y. A. Glazyrina. // IEEE Sensors journal. - 2010. – V. 10, №11. P. - 1699-1704.
 5. Кацнельсон Б.А. Экспериментальные данные к оценке пульмоно-токсичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазонов [Текст] / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, С.В. Кузьмин, Т.Д. Дегтярёва, М.П. Сутункова, И.А. Минигалиева, О.С. Ерёмченко, Е.П. Киреева, М.Я. Ходос, А.Н. Козицина, Н.А. Малахова, Ю.А. Глазырина, В.Я. Шур, Е.И. Шишкин, Е.В. Николаева, И.Е. Валамина // Токсикологический вестник. - 2010. -№2. - С. 18-25.
 6. Устинов Л.В. Электрохимические методы определения наночастиц феррита в клеточных культурах [Текст] / Л.В. Устинов, Ю.А. Глазырина, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Тез. докл. XVII Росс. молод. науч. конф. «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». Екатеринбург. – 2007. - С. 156.
 7. Глазырина Ю.А. Новый гибридный электрохимический иммуноанализ с магнитной сепарацией [Текст] / Ю.А. Глазырина, Л.В. Устинов, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Тез. докл. XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Москва. – 2007. С. 119.
 8. Устинов Л.В. Электрохимический метод исследования взаимодействия наночастиц с клетками [Текст] / Л.В. Устинов, Ю.А. Глазырина, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Тез. докл. XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Москва. – 2007. - С. 239.
 9. Глазырина Ю.А. Применение нанотехнологий в разработке био- и химических сенсоров. [Текст] / Ю.А. Глазырина, Л.В. Устинов, С.С. Деденева, А.Н. Козицина, А.З. Брайнина // Тез. докл. научн.-практич. конф. «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве». Томск. - 2007. - С. 48-49.
 10. Козицина А.Н. Наноструктурированные материалы в химическом и биохимическом анализе [Текст] / А.Н. Козицина, Л.В. Устинов, Ю.А. Глазырина, Х.З. Брайнина // Тез. докл. 11-й Международный семинар-ярмарка «Российские технологии для индустрии» «Нанотехнологии в электронике, энергетике, экологии и медицине». С-Петербург. – 2007. - С. 79.

11. Brainina K. Electroanalysis: nanoparticles as modifiers and markers [Text] / K. Brainina, N. Malakhova, N. Stojko, A. Kozisina, Y. Glazyrina, L. Ustinov // Book of Abstracts of the 12th International Conference on Electroanalysis. Prague, Czech Republic. - 2008. – P. 20.
12. Брайнина Х.З. Наночастицы - маркеры в электрохимическом иммуноанализе [Текст] / Х.З. Брайнина, А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина // Матер. VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием. Уфа-Абзаково. - 2008. – С. 14.
13. Козицина А.Н. Синтез и применение магнитных наночастиц оксида железа Fe_3O_4 в разработке биосенсоров [Текст] / А.Н. Козицина, Ю.А. Квашнин, Ю.А. Глазырина, Г.Л. Русинов, А.И. Матерн, В.Н. Чарушин, Х.З. Брайнина // Матер. Третьей Всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2009». Екатеринбург. – 2009. - С. 826.
14. Brainina Kh. Z. Electrochemical immunosensor for *Salmonella typhimurium* based on magnetic nanoparticles [Text] / Kh. Z. Brainina, A. N. Kozitsina, Y. A. Glazyrina, // Book of Abstracts of the Ninth workshop on (Bio)sensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis. Montreal, Canada. - 2009. – P. 77.
15. Глазырина Ю.А. Электрохимическое определение патогенных микроорганизмов в биологических и природных объектах с помощью магнитных наночастиц [Текст] / Ю.А. Глазырина, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Матер. III Всероссийской конференции с международным участием "Аналитика России". Краснодар. - 2009. – С. 385.
16. Глазырина Ю.А. Электрохимический гибридный метод определения патогенных микроорганизмов в биологических и природных объектах на основе магнитных наночастиц [Текст] / Ю.А. Глазырина // Тез. докл. Съезда аналитиков России. Москва (пансионат «Клязьма»). – 2010. – С.81.
17. Козицина А.Н. Электрохимические методы в бесферментных химических и иммуносенсорах на основе металлорганических комплексов, наночастиц металлов/оксидов. Токсичность наночастиц. [Текст] / А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, Н.Н. Малышева, Е.Л. Поморцева, Х.З. Брайнина // Матер. Симпозиума с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии». – Томск. - 2010. – С.6-9.
18. Глазырина Ю.А. Электрохимический гибридный метод определения *Salmonella typhimurium* в биологических и природных объектах на основе магнитных наночастиц [Текст] / Ю.А. Глазырина, А.Н. Козицина, Х.З. Брайнина // Матер. Симпозиума с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии». – Томск. - 2010. – С.68.