

Пьезокварцевые иммуносенсоры. Аналитические возможности и перспективы

Т.Н.Ермолаева, Е.Н.Калмыкова

Липецкий государственный технический университет
398060 Липецк, ул. Московская, 30, факс (4742)31–0473

Проанализировано современное состояние исследований в области разработки пьезокварцевых иммуносенсоров. Рассмотрены условия проведения анализов с использованием таких датчиков; виды иммунохимических реакций, детектируемых с помощью пьезограмметрических сенсоров; способы иммобилизации биорецепторных молекул на поверхности электродов пьезокварцевых резонаторов. Особое внимание уделено практическому применению разработанных сенсоров при определении микроорганизмов, а также высоко- и низкомолекулярных соединений в жидких средах.

Библиография — 172 ссылки.

Оглавление

I. Введение	445
II. Особенности функционирования гравиметрических пьезокварцевых иммуносенсоров в газовых и жидких средах	446
III. Виды иммуноанализа	448
IV. Методы иммобилизации биомолекул	450
V. Условия регенерации биоселектирующих покрытий	453
VI. Применение пьезокварцевых иммуносенсоров	453
VII. Заключение	456

I. Введение

В последние годы разработка иммуносенсоров становится одним из наиболее привлекательных и перспективных направлений биоаналитической химии. Отличительной особенностью этого вида аналитических устройств является способность определять содержание интересующих компонентов в сложных по составу смесях с высокой чувствительностью и селективностью практически без предварительной подготовки пробы. Конструкция иммуносенсора, как и любого биодатчика, включает два основных функциональных блока: биоселектирующий материал (рецептор) и находящийся с ним в непосредственном контакте детектор (физический преобразователь, трансдьюсер). Рецептор взаимодействует с определяемым веществом, детектор превращает генерируемый сигнал биохимического взаимодействия в аналитический отклик, который может быть далее преобразован и представлен в виде цифровых данных.

Высокая избирательность и чувствительность иммуноанализа обусловлена использованием в качестве ключевых

реагентов антител (Ат) — защитных белков, которые образуются в организме высших животных в ответ на введение чужеродных агентов — антигенов (Аг).^{1,2} Механизм обезвреживающего действия антител состоит в высокоспецифичном распознавании комплементарных антигенов и образовании иммунного комплекса (Аг — Ат) с последующим выведением его из организма.

Традиционные иммунологические методы позволяют определять очень низкие концентрации антител или антигенов (высокомолекулярных иммуногенов и низкомолекулярных гаптенгов), однако для этого, как правило, требуется длительное время. Иммунные биодатчики фиксируют взаимодействие антиген — антитело в течение десятков секунд. При работе иммуносенсоров фактически реализуются процессы, аналогичные тем, которые протекают в живых организмах. Образование иммунного комплекса приводит к изменению напряжения, тока, оптических свойств (таких как показатель преломления), акустических характеристик и т.д., поэтому для регистрации биохимического взаимодействия могут применяться различные физические преобразователи: оптические, электрохимические, акустические, в том числе пьезокварцевые.

Воздействие аналита на пьезокварцевый сенсор приводит к изменению частоты (f), амплитуды (A) и фазы (φ) колебаний преобразователя.³ Пьезокварцевые сенсоры демонстрируют высокую чувствительность к изменению не только массы, но и некоторых физико-химических свойств (вязкости, плотности, упругости, проводимости и т.д.) рецепторного слоя, а также свойств жидкости, находящейся в контакте с сенсором.^{4,5} Наиболее изучены иммуносенсоры, действующие по принципу микровесов. Для повышения стабильности и точности измерения, увеличения скорости получения сигнала

Т.Н.Ермолаева. Доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой химии ЛГТУ. Телефон: (4742)32–8155, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru

Е.Н.Калмыкова. Кандидат химических наук, доцент той же кафедры. Телефон: (4742)32–8155, e-mail: kalmyken@stu.lipetsk.ru
Область научных интересов авторов: исследования, связанные с разработкой пьезокварцевых иммуносенсоров для анализа жидких сред.

Дата поступления 31 марта 2005 г.

лов сенсоров, работающих при высокой демпфирующей нагрузке жидкости, в современных приборах применяют высокоточные цифровые методы измерения частотных сигналов и эффективные методы фильтрации помех. Однако это направление требует отдельного рассмотрения и в предлагаемом обзоре не обсуждается.

Аналитическим сигналом гравиметрических сенсоров служит уменьшение частоты колебаний сенсора (Δf) при увеличении массы его рецепторного покрытия в результате селективного иммунохимического связывания.

Наряду с высокой чувствительностью гравиметрических иммуносенсоров (на уровне пикограммов) следует отметить возможность прямой регистрации биохимических взаимодействий без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных, радиоактивных, люминесцентных и др.), что необходимо в классических процедурах твердофазного иммуноанализа (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) и близкородственных вариантах). Присутствие неполярных органических растворителей, уменьшающих, как правило, чувствительность методов с использованием меток, не представляет опасности для непосредственного взаимодействия антител и антигенов, регистрируемого пьезокварцевым детектором.⁶ Кроме того, к достоинствам гравиметрических иммуносенсоров относятся малая инерционность, легкость в эксплуатации, портативность, возможность включения в мультисенсорные системы, а также в системы сбора и обработки информации.

По чувствительности пьезокварцевое детектирование сопоставимо, а в некоторых случаях превышает широко распространенные оптические, спектрофотометрические, электрохимические, флуоресцентные, иммуноферментные и др. методы регистрации иммунохимических взаимодействий, несколько уступая лишь рефлексомерии.^{7,8} В отличие от твердофазного иммуноанализа, в котором предусматривается одноразовое использование реагентов, иммуносенсоры достаточно легко регенерируются. Таким образом, целесообразно их более широкое применение для проведения рутинных анализов, так как при этом существенно снижается стоимость единичного определения.

Теоретические аспекты функционирования пьезокварцевых биодатчиков и особенности их практического использования при определении разнообразных аналитов рассмотрены в обзорах^{6,8–19}. При получении аналитического отклика сенсора выделяют два процесса: изменение массы покрытия за счет образования гетерогенного иммунного комплекса и преобразование этого приращения массы в электрический сигнал.

Создание гравиметрических сенсоров различных конструкций (тест-средства, детекторы для проточно-инжекционного анализа) на основе высокоспецифичных взаимодействий (антитела–антигены, ферменты–субстраты, рецепторы–лиганды (гормоны, цитокинины), авидин–биотин, белок А–антитела, ДНК–ДНК или РНК, транспортные белки–различные молекулы и ионы) позволяет расширить область их применения. Возможно использование таких сенсоров в медицине, пищевой и парфюмерной промышленности, фармацевтической химии, сельском хозяйстве (ветеринарии, садоводстве, растениеводстве), биотехнологии, горнодобывающей и военно-промышленной отраслях, а также при проведении экологического мониторинга токсикантов и бактериологических загрязнителей почв и сточных вод.

К сожалению, в нашей стране исследования, связанные с изучением теоретических подходов, необходимых для разработки массочувствительных иммуносенсоров, практически не проводятся, в то время как в зарубежных странах это направление активно развивается.

В данном обзоре обсуждены различные виды иммуноанализа, осуществляемого с использованием пьезокварцевых преобразователей, рассмотрены условия его проведения и способы иммобилизации биорецепторных молекул. Проанализированы итоги и перспективы практического применения гравиметрических иммуносенсоров, предназначенных для определения микроорганизмов, высоко- и низкомолекулярных биологически активных веществ в жидких средах.

II. Особенности функционирования гравиметрических пьезокварцевых иммуносенсоров в газовых и жидких средах

Конструкция акустических микровесов (пьезокварцевых резонаторов, работающих по принципу объемных акустических волн) обычно включает тонкий диск природного или синтетического кварцевого кристалла, на обеих сторонах которого путем термического напыления сформированы электроды из различных металлов — золота, серебра, алюминия, никеля, хрома.^{18–21} Чтобы минимизировать влияние температуры, диск вырезают вдоль определенного среза кристалла — так называемого АТ-среза, наиболее термически стабильного в интервале 10–50°C.¹²

Пьезоэлектрически активна только область между электродами, по мере удаления от центра массочувствительность пьезокварцевого резонатора существенно снижается. Наиболее часто используют кристаллы с диаметром кварцевой пластины 10–16 мм, золотыми (иногда серебряными) электродами и с собственной частотой колебаний 5–15 МГц. В литературе имеются сообщения о применении резонаторов с более высокими частотными характеристиками: 30 (см.^{22,23}), 70 и даже 110 МГц.^{24,25} Тонкие кристаллы, резонирующие при высоких частотах, более чувствительны к изменению массы, но их недостатком является хрупкость и значительный уровень «шума».

Воздействие переменного электрического потенциала между электродами вызывает внутреннее механическое напряжение, что приводит к появлению деформации кристалла. Резонанс достигается при включении кристалла в колебательный контур, где электрические и механические колебания совпадают с основной частотой кристалла. Собственная частота колебаний резонатора зависит от постоянных величин — размера и структуры пластины (толщины, плотности, шероховатости, формы и типа среза), а также от изменяющихся параметров — массы металлических электродов и некоторых внешних факторов (плотности и вязкости газа или жидкости, в которых проводятся измерения; состава, ионной силы, pH растворов).^{4,5,10,11} Осциллирующая частота кристалла АТ-среза линейно уменьшается при увеличении массы материалов, осаждающихся на поверхности электродов, что выражается уравнением Зауэрбрея:²⁶

$$\Delta f = - \frac{2.3f_0^2 10^6 \Delta m}{A},$$

где Δf — изменение частоты колебаний кристалла (в Гц), f_0 — собственная частота колебаний кристалла (в МГц), Δm — масса нанесенного на электрод рецепторного покрытия (в г), A — площадь поверхности электрода (в см²).

Это соотношение верно только для небольших приращений массы. Превышение оптимальной нагрузки не только снижает чувствительность определений, но и приводит к срыву сигнала, поэтому коммерческие пьезокварцевые микровесы рассчитаны на диапазон измерений от ~1 нг·см⁻² до ~100 мкг·см⁻².

1. Специфичность иммуносенсоров в газовых средах

Впервые использование антигенов в качестве покрытий электродов пьезокварцевых микровесов было предложено²⁷ в 1972 г., однако интерес исследователей к этому направлению возник несколько позднее. В 1986 г. появилось сообщение²⁸ о высокочувствительном определении (на уровне ppb) пестицида паратиона в воздухе с помощью иммобилизованных на пьезокварцевом кристалле антител к нему. Следы влаги, присутствующие в тонкой пленке покрытия сенсора, обеспечили протекание иммунохимической реакции в газовой фазе. Пьезокварцевые сенсоры с иммобилизованными белками (антителами) были успешно использованы для определения атмосферных загрязнителей, в том числе диоксида серы, монооксида углерода, хлороводорода, диоксида азота, аммиака, фосфорорганических пестицидов и др.^{28–32}

Однако в литературе имеются сообщения, опровергающие протекание специфических иммунохимических реакций в сухих пленках на основе антител (покрытий сенсоров) при определении пестицидов в воздухе.³³ Следует отметить, что в настоящее время для анализа газов пьезокварцевые иммуносенсоры практически не используются. Это обусловлено сложностью регистрации аналитического сигнала из-за незначительных изменений массы покрытия сенсоров при прямом детектировании низкомолекулярных веществ.

2. Особенности функционирования сенсора в жидких средах

Ранние попытки применения пьезокварцевых сенсорных систем для измерений в жидких средах были неудачными, так как кристалл при погружении в раствор прекращал осциллировать. Для преодоления этого затруднения сенсор выдерживали в анализируемом растворе и после высушивания измеряли приращение массы в газовой фазе. В этом случае частотные сдвиги сенсора подчинялись уравнению Зауэрбрея. Метод известен под названием «окунуть и высушить» («dip and dry»).^{10, 27, 34, 35} Другой путь состоял в разработке^{36, 37} принципиально новой схемы возбуждения, предназначенной для анализа жидкости, и использовании проточной ячейки детектирования, обеспечивающей контакт анализируемого раствора только с одной стороной кристалла.^{5, 21, 38, 39}

На резонансную частоту кристалла, погруженного в раствор, существенное влияние оказывают характеристики жидкой фазы, и уравнение Зауэрбрея не выполняется. Унифицированного уравнения, учитывающего вклад всех факторов среды в величину отклика пьезокварцевого сенсора в жидкости, до настоящего времени не предложено. Сигнал зависит главным образом от структуры межфазной границы между покрытием сенсора и окружающим раствором. Эти пограничные эффекты нивелируются при контактировании только одной стороны резонатора с раствором и использовании оптически отполированных кристаллов.

С учетом перечисленных выше ограничений возможны два варианта применения пьезокварцевых иммуносенсоров: как тест-средств и детекторов в проточно-инжекционном анализе.

Первые исследования с применением пьезокварцевых иммуносенсоров для сравнительной оценки активности и специфичности антител в жидкости были выполнены²⁷ методом «окунуть и высушить». С 1980-х гг. это направление начало развиваться более активно: были предложены метод идентификации подклассов антител⁴⁰ и непрямой/конкурентный метод определения антигенов.⁴¹ В 1990-х гг. число определяемых соединений значительно возросло, появились сенсоры для определения целого ряда микроорганиз-

мов,^{42–52} клеток крови,^{53–56} альбумина,^{38, 57} атразина,^{17, 58, 59} человеческого трансферрина,⁶⁰ инсулина,⁶¹ кокаина⁶² и иммуноглобулина М (IgM).^{63, 64} Основные проблемы при выполнении анализа этим методом связаны с условиями экспонирования сенсора в исследуемом растворе и последующего высушивания, а также с влиянием природы растворителя пробы, удерживаемого покрытием.

Диапазон веществ, определяемых в жидких средах с использованием пьезокварцевых сенсоров, разнообразен — это высоко- и низкомолекулярные соединения, клетки. В работе⁴² впервые предложен способ определения микроконцентрации *Candida albicans* в интервале 10^6 – $5 \cdot 10^8$ клеток $\cdot$ мл⁻¹. Взаимодействие сенсорного покрытия с другими видами дрожжей или другими типами антигенов отсутствовало, что говорит о высокой специфичности анализа. Впоследствии такой подход был применен при создании методик определения целого ряда бактерий (*Salmonella typhimurium*,⁴⁴ *Salmonella paratyphi*,⁴⁵ *Listeria monocytogenes*,^{46, 47} *Vibrio cholera*⁴⁸), вирусов (возбудителя диареи,⁴⁹ герпеса^{50, 51}) и клеточных структур (гранулоцитов,⁵³ Т-лимфоцитов⁵⁴ и эритроцитов человека^{55, 56}).

Несмотря на относительно невысокую воспроизводимость результатов вследствие влияния гидратации и неодинакового удерживания растворителя рецепторной поверхностью, способ «окунуть и высушить» не потерял своей значимости до настоящего времени. Недавно опубликованы работы по определению с его помощью некоторых микроорганизмов,^{52, 65, 66} белков^{67–69} и токсикантов.^{70, 71} Преимущество этого метода состоит в возможности использовать иммуносенсоры в качестве тест-средств, что удобно при проведении внелабораторной диагностики, когда тест-средства являются быстродействующими инструментами при скрининге объектов окружающей среды. Надежность результатов определения повышается, а предел обнаружения снижается при увеличении времени экспонирования сенсора в анализируемой пробе, тщательном промывании и высушивании биослоя до постоянной массы.

Для нивелирования неспецифических взаимодействий компонентов пробы с рецепторным покрытием сенсора рекомендована⁶⁹ система из двух сенсоров — индикаторного и сенсора сравнения. На поверхности сенсоров иммобилизуют одинаковые биорецепторные молекулы, но у сенсора сравнения предварительно блокируют активные центры.

Более перспективно применение пьезокварцевых иммуносенсоров в проточно-инжекционном анализе. В этом случае значительно сокращается время единичного определения (до нескольких минут) и регистрация сигнала осуществляется в режиме реального времени.⁷² Кроме того, существенно повышается воспроизводимость определения (регистрируется относительное изменение частотного сдвига), снижается влияние неспецифических взаимодействий (соединения, сорбированные покрытием, удаляются с поверхности сенсора буферным раствором-носителем), появляется возможность многократного использования сенсора после регенерации биочувствительного слоя в конце каждого этапа измерения.

При выполнении анализа используют проточную ячейку детектирования малого объема, пропускающую через нее раствор с заданной скоростью при помощи насоса. Обычно объем такой ячейки составляет 35–100 мкл.^{5, 39, 73}

К настоящему времени разработано большое число проточных иммуносенсоров для определения как высокомолекулярных аналитов (бактерий, вирусов, фагов; антител, белковых антигенов, нуклеиновых кислот), так и низкомолекулярных веществ (лекарственных препаратов, метаболитов и экотоксикантов).

III. Виды иммуноанализа

Методики иммуноанализа с применением пьезокварцевых иммуносенсоров можно классифицировать по следующим критериям:

- по природе применяемого рецепторного слоя (антигена, антигены, гаптен-белковые конъюгаты);
- по типу биохимического взаимодействия, вызывающего аналитический сигнал (прямое, конкурентное, вытеснительное детектирование и анализ с увеличением сигнала приращенной массы за счет модифицирования аналита);
- по принципу получения аналитического сигнала (увеличение или уменьшение массы биорецепторного слоя);
- по технике выполнения измерений (одно- или двустадийный процесс; метод «окунуть и высушить», проточно-инжекционный анализ).

Наиболее часто используют классификацию, учитывающую тип биохимического взаимодействия и принцип получения аналитического сигнала. К настоящему времени наибольшее развитие получили следующие варианты иммуноанализа с применением пьезокварцевых преобразователей: прямой, непрямой/конкурентный и заместительный.^{13, 16} Для повышения чувствительности рекомендованы сэндвич-анализ и различные приемы, увеличивающие массу сорбируемых молекул и, следовательно, аналитический сигнал сенсора.

1. Прямое детектирование

Это наиболее простой метод, осуществляемый в одну стадию при контакте рецепторного слоя сенсора с аналитом. Уменьшение резонансной частоты, обусловленное образованием иммунного комплекса на поверхности электрода, прямо пропорционально концентрации определяемого компонента (рис. 1). Такой вид анализа используется как в варианте «окунуть и высушить», так и в проточном варианте. Электроды сенсора модифицируют антигенами или моноклональными антителами, а также сыворотками, содержащими поликлональные антитела.

Для повышения селективности определения сенсор предварительно обрабатывают раствором неионогенного детергента или неактивного белка, который не дает перекрестных взаимодействий с компонентами анализируемого образца (бычьего сывороточного альбумина (BSA), желатина и т.п.), но связывается с неспецифическими центрами рецепторного слоя сенсора. Например, рецепторный слой сенсора на основе ДНК слабо взаимодействует с молекулами BSA, вызывая лишь незначительный частотный сигнал, в то время как сыворотка крови больных с симптомами аутоиммунного заболевания, содержащая антитела к ДНК, дает аналитические отклики на уровне сотен герц.⁷⁴

Прямое детектирование наиболее успешно используется для определения высокомолекулярных объектов (соматических клеток, микроорганизмов, макромолекул белков, ДНК,

РНК, антител, нуклеиновых кислот, гликопротеинов, гликолипидов и других антигенов), поскольку их сорбция вызывает значительное приращение массы рецепторного слоя.

Считается, что прямое связывание небольших по массе молекул не может быть зафиксировано пьезокварцевым иммуносенсором. Например, для кристалла с собственной частотой колебаний 10 МГц и чувствительностью $0.227 \text{ Гц} \cdot \text{нг}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ сорбция вещества в количестве $4.4 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$ вызывает изменение частоты, равное 1 Гц.¹³ Монослой антител емкостью $500 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$ содержит $7 \cdot 10^{-12}$ моль связывающих сайтов. Для антигена с небольшой молекулярной массой (~ 1000 Да) максимальная связывающая способность соответствует $2.7 \cdot 10^{-12}$ моль $\cdot \text{см}^{-2}$ и может вызывать лишь незначительные изменения резонансной частоты сенсора, соответствующие нескольким герцам (сигнал на уровне шума). Однако известно использование прямого детектирования для идентификации низкомолекулярных веществ, например гербицида атразина⁷¹ и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты,^{13, 75} предел обнаружения которых составляет $0.24\text{--}0.27 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$. Таким образом, наблюдается несоответствие между экспериментально измеренными частотными сдвигами и расчетными величинами, что связывают с изменением вязкоупругих свойств пограничных слоев жидкости вследствие образования комплексов с низкомолекулярным аналитом.

Для определения небольших по массе молекул чаще применяют непрямой/конкурентный, сэндвич- и другие виды анализа.

2. Конкурентный анализ

Одностадийный непрямой/конкурентный анализ гаптенов с применением пьезокварцевых сенсоров впервые был осуществлен⁴¹ в 1980 г. Этот вид анализа имеет ряд особенностей. Если в обычном иммунохимическом анализе конкуренция за сайты связывания происходит между свободным и меченым какой-либо меткой аналитом, то при использовании пьезокварцевых иммуносенсоров конкурентами служат определяемый свободный аналит, присутствующий в растворе, и иммобилизованный в качестве биорецепторного слоя (гаптен-белковый конъюгат) (рис. 2). Величина получаемого аналитического сигнала сенсора обратно пропорциональна концентрации гаптена в пробе.

Такой способ наиболее удобен при обнаружении различных по природе низкомолекулярных гаптенов: витаминов, лекарственных веществ, гормонов, метаболитов, гербицидов и т.д. По чувствительности конкурентный анализ превосходит прямой,^{18, 58} но диапазон определяемых содержаний на 1–2 порядка уже.

Для осуществления конкурентного анализа рецепторный слой может быть сформирован не только гаптен-белковыми конъюгатами, но и антителами. В последнем случае в каждую пробу добавляется фиксированное количество гаптен-белкового конъюгата; этот вариант получил название альтерна-

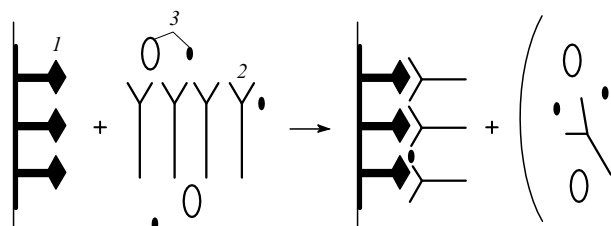


Рис. 1. Схема прямого анализа антител.

1 — антиген (гаптен), 2 — антитело, 3 — неспецифические компоненты смеси.

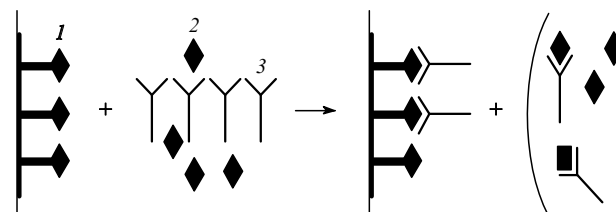


Рис. 2. Схема непрямого/конкурентного анализа.

1, 2 — иммобилизованный и свободный в пробе гаптен соответственно, 3 — антитело.

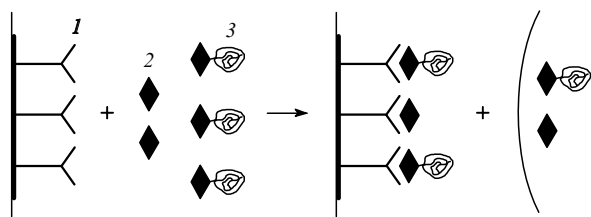


Рис. 3. Схема альтернативного конкурентного анализа. 1 — антитело, 2 — гаптен, 3 — гаптен-белковый конъюгат.

тивного конкурентного анализа (рис. 3). Конъюгированный и свободный гаптены равновероятно связываются с активными сайтами иммобилизованных антител, поэтому чем ниже концентрация свободного анализита в пробе, тем большее количество конъюгированного гаптена прикрепляется к рецепторному слою сенсора. Таким образом, сорбция конъюгированного анализита способствует значительному увеличению частотного отклика.

Этот вид иммуноанализа успешно применен¹⁷ для определения содержания производных триазина. Величина частотного сдвига, вызванного связыванием триазин-белкового конъюгата рецепторным слоем, обратно пропорциональна концентрации триазина (в диапазоне $0.01-1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$). Несмотря на более низкую чувствительность, альтернативный метод характеризуется более широким диапазоном определяемых содержаний (по сравнению с конкурентным).

3. Двустадийный сэндвич-анализ

Этот вид анализа осуществляется^{40,76} с применением соответствующих вторичных, или видовых, антител, которые взаимодействуют с антителами иммунного комплекса как с антигенами, на которые они получены. Таким образом, вторичные антитела выступают в качестве усилителей аналитического сигнала, образуя сэндвич-комплексы с определяемыми антителами (рис. 4). При этом достигается значительное увеличение не только селективности, но и чувствительности определения. Например, использование сэндвич-анализа позволило установить⁷⁷ концентрацию холерного токсина в растворе на уровне $1 \cdot 10^{-4} \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Анализ выполняют в две стадии. Сначала происходит связывание иммобилизованного антигена с определяемыми антителами (специфическими и неспецифическими). Затем вводят вторичные антитела, которые присоединяются только к специфическим антителам, образуя своеобразный сэндвич. Классическим примером использования данного метода является определение аллерген-специфичного иммуноглобу-

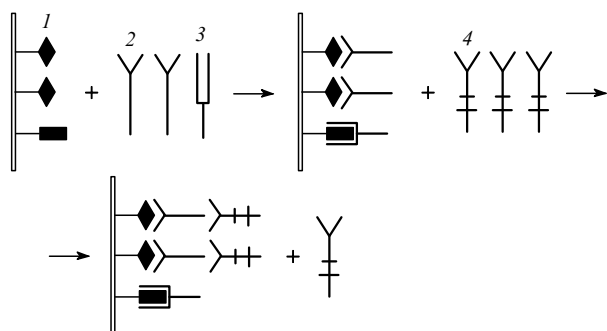


Рис. 4. Схема осуществления сэндвич-анализа. 1 — антиген, 2 — специфическое антитело, 3 — неспецифическое антитело, 4 — вторичное антитело.

лина (IgE) в сыворотке крови больных с симптомами аллергических дерматитов.⁶⁸ На поверхности электрода сенсора иммобилизуют аллергенный белок (Der p), выделенный из дерматофагоидов. При контакте сенсора с образцом сыворотки крови больного на поверхности рецепторного слоя связывались антитела различных классов, после чего осуществлялось дифференцирование сорбированных антител при контактировании сенсора с вторичными антителами (к человеческому IgE). Специфическое распознавание вторичными антителами позволяет отличить присоединенные аллерген-специфические антитела от иммуноглобулинов других классов (IgG, IgM), присутствующих в сыворотке крови.

Другой иллюстрацией успешного применения сэндвич-анализа может служить способ⁷⁸ определения человеческого сывороточного альбумина (HSA), базирующийся на образовании комплекса HSA с двумя типами антител, при этом аналитический сигнал сенсора в три раза больше по сравнению с полученным методом прямого детектирования.

Сэндвич-анализ может проводиться в одну стадию для прямого измерения антигенов конкурентным способом. Таким способом было установлено^{13,76} содержание тестостерона в биологической жидкости на уровне $13.6 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

4. Анализ с увеличением массы анализита

Для повышения чувствительности определения низкомолекулярных соединений наряду с сэндвич-анализом используют другие приемы, увеличивающие аналитический сигнал. Например, описано модифицирование сорбатов коллоидными,^{79,80} латексными и др. частицами.⁸¹⁻⁸³ В работе¹³ такие способы выделены в самостоятельный вид анализа (mass amplified assay — анализ с увеличением массы анализита). Схемы анализа представлены на рис. 5.^{82,83} Для модифицирования антител использовали коллоидные частицы, которые значительно увеличивают размер и массу сорбируемых молекул. Анализ может быть выполнен конкурентным (рис. 5,а) и сэндвич-способами (рис. 5,б).

В первом случае белковые молекулы антител, модифицированные твердыми коллоидными частицами, могут присоединиться либо к свободному анализиту в растворе, либо к анализиту, иммобилизованному на поверхности электрода сенсора. Таким образом, высокая концентрация анализита ингибирует прикрепление антител к рецепторному слою. Величина аналитического сигнала обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена.

Во втором случае, осуществляемом в две стадии (I и II), модифицированные коллоидными частицами молекулы подобно вторичным антителам взаимодействуют с ранее

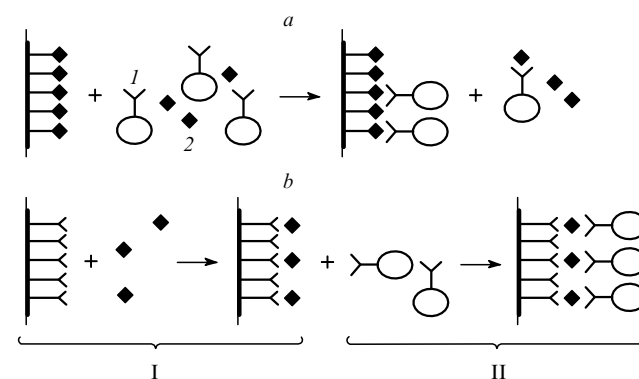


Рис. 5. Схема анализа с модифицированными антителами. а — конкурентный способ, б — сэндвич-анализ; 1 — модифицированное антитело, 2 — анализит.

прикрепленными к рецепторному слою молекулами аналита. В обоих случаях масса коллоидных частиц значительно усиливает частотный сигнал сенсора. В качестве коллоидных частиц обычно используют золи золота, свинца, сульфидов кадмия или цинка, оксидов хрома, титана, железа.

Для усиления сигнала удобно применять латексную агглютинацию. Такой подход использован³⁸ при определении бактерий *Escherichia coliform* в растворе в диапазоне концентрации $10^6 - 10^8$ клеток $\cdot$ мл⁻¹. Частицы латекса, модифицирующие антитела к *E. coli*, вводились в реакционную смесь.⁸⁴ После присоединения клеток к антителам, иммобилизованным на электроде сенсора, анти-*E. coli*, прикрепленные к частицам латекса, образовывали сэндвич-комплекс с клетками, связанными с антителами на поверхности электрода сенсора.

5. Вытеснительный анализ

Этот вид анализа успешно используется при характеристике устойчивости аффинных комплексов (Аг — Аг, ДНК — белок, ДНК — РНК и др.) для изучения кинетики диссоциации, а также для определения концентрации аналитов. Если для оценки низких концентраций небольших молекул предпочтителен конкурентный анализ, то для макромолекул более удобен вытеснительный анализ. Принцип определения состоит в измерении величины уменьшения массы гетерогенного комплекса в результате диссоциации под воздействием избытка одного из компонентов. Анализ осуществляют в два этапа (рис. 6).

Примером этого вида иммуноанализа может служить установление⁴⁷ содержания микроорганизмов *Listeria monocytogenes* в молоке (на уровне $2.5 \cdot 10^5 - 2.5 \cdot 10^7$ клеток $\cdot$ мл⁻¹). К предварительно иммобилизованному на поверхности электрода сенсора белковому антигену, выделенному из клеток микроорганизма *Listeria*, прикрепляются соответствующие антитела, содержащиеся в пробе. Это приводит к уменьшению частоты колебаний сенсора. Далее происходит вытеснение антител из гетероиммунокомплекса под действием клеток *Listeria*, дополнительно вводимых в пробу. Количество вытесненных антител прямо пропорционально концентрации клеток *Listeria* в образце. Аналогично было определено⁸⁵ содержание бактерий *Pseudomonas aeruginosa* в образцах молока и питьевой воды.

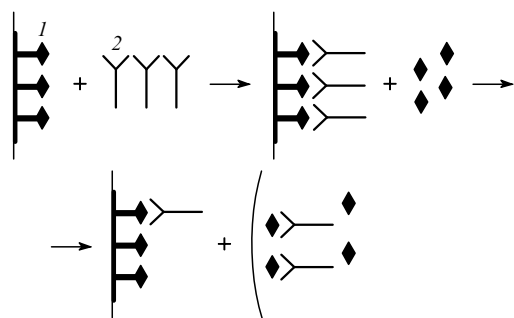


Рис. 6. Схема вытеснительного иммуноанализа.
1 — антиген, 2 — специфическое антитело.

IV. Методы иммобилизации биомолекул

Чувствительность, селективность и воспроизводимость определения высоко- и низкомолекулярных соединений с помощью пьезокварцевого иммуносенсора существенно зависят от способа иммобилизации рецепторных молекул на поверхности его электродов.

Основные требования, предъявляемые к качеству био-рецепторного слоя, таковы:⁸⁶

- прочность закрепления рецепторных молекул на поверхности электрода;
- сохранение высокой активности иммобилизованных биомолекул;
- равномерность распределения активных центров связывания по всей площади электрода;
- физическая и химическая устойчивость покрытия в течение цикла измерения при контакте с жидкостью (включая устойчивость в процессе регенерации);
- минимальная масса рецепторного слоя (чем меньше масса покрытия, тем большая величина приращенной массы аналита может быть определена микровзвешиванием).

При выборе способа иммобилизации необходимо учитывать природу металлического электрода. Наиболее часто используют пьезокварцевые резонаторы с золотыми электродами вследствие их химической устойчивости, поэтому практически все известные способы иммобилизации разработаны для золотых электродов. Однако в последнее время становятся привлекательными кристаллы с серебряными электродами из-за их относительно низкой стоимости и в связи с большей сорбционной эффективностью.^{87,88} В работе⁶⁸ показано, что иммуносенсоры на основе серебряных электродов, модифицированных липоевой кислотой с гидроксидом *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимидом как конденсирующим агентом, проявляют в 1.5 раза более высокую чувствительность по сравнению с сенсорами на основе золотых электродов. Недостатком является необходимость тщательно защищать серебряные электроды из-за их высокой реакционной способности. Это достигается, например, путем формирования подложки из полиэтилена, дающего равномерный слой, который полностью покрывает поверхность электрода.

Известные к настоящему времени методы иммобилизации белковых молекул можно условно разделить на несколько групп:^{13,16} физическая сорбция, включение в матрицу, химическая сорбция.

Каждый из методов имеет свои достоинства и недостатки. Во многих случаях комбинируют различные приемы, но заранее предсказать наиболее подходящий способ для достижения конкретной цели не всегда возможно. Необходима экспериментальная проверка качества иммобилизации биомолекул и устойчивости полученного рецепторного покрытия.

1. Физическая сорбция

Самым простым и быстрым способом иммобилизации белков, проводимым в мягких условиях на поверхности электрода кристалла, является физическая сорбция. Она осуществляется за счет неспецифических взаимодействий или водородных связей⁸⁹ и обеспечивает сохранение активности белковых молекул,^{70,73,90} а также формирование слоя с невысокой плотностью.⁹¹ При этом почти всегда сохраняется число активных центров антител, хотя в некоторых случаях отмечают⁹²⁻⁹⁴ снижение функциональной активности из-за конформационных изменений молекул. Количество сорбированного белка, а значит, и чувствительность сенсора определяется природой металла и гидрофобностью белка, которая зависит от pH, ионной силы раствора и температуры,⁹⁵ а также от времени инкубирования сенсора в растворе антител. В работе⁹⁶ показано, что после инкубирования в течение четырех суток рецепторное покрытие выдерживало до 20 измерительных циклов без снижения аналитического отклика.

Физическая сорбция применяется достаточно часто, например для получения рецепторных покрытий на основе

козых антител к рибину,⁷³ антител к *Vibrio cholera*,⁴⁸ вирусу герпеса,^{49, 50} рекомбинантным фрагментам специфических антител к вирусу иммунодефицита человека (HIV)^{97, 98} и т.п. Количество иммобилизованных антител и клеток достаточно точно оценивается по разности частотных сдвигов модифицированного и чистого пьезокварцевого кристалла.

Основными недостатками такой иммобилизации являются малая величина сорбционной емкости и неустойчивость покрытия, что снижает воспроизводимость определения и срок службы сенсора. Так как метод не обеспечивает получения развитой поверхности, необходимой для ковалентной иммобилизации, чувствительность биослоя невысока.⁹¹

С помощью физической сорбции можно проводить не только непосредственное формирование биорецепторного покрытия электрода сенсора, но и создавать промежуточный белковый слой, обеспечивающий достаточно прочное связывание как с металлической поверхностью электрода, так и с молекулами иммунореагентов. В качестве такой белковой прослойки часто используется белок А,^{61, 86, 87, 90, 98–100} образующий достаточно прочные комплексы с золотом в нейтральной среде (константа связывания составляет 10^8 л·моль⁻¹ (см.¹⁰¹)). Одновременно белок А, представляющий собой полипептид из *Staphylococcus aureus*, достаточно активно связывается специфически с молекулами иммуноглобулинов (особенно класса IgG), не затрагивая при этом активных центров антител, что способствует сохранению активности антител в иммобилизованном состоянии.^{90, 102} Данный способ иммобилизации обеспечивает не только высокую чувствительность и связывающую способность биорецепторного слоя, но и его эластичность, что важно для стабильной работы пьезокварцевого иммуносенсора.¹⁰³ Сенсоры для определения инсулина,¹⁰⁴ некоторых вирусов и бактерий¹⁰⁵ с биорецепторным покрытием, сформированным из молекул белка А, показали высокую чувствительность и стабильность работы даже спустя несколько месяцев.

Дальнейшим развитием метода является изменение структуры белковой молекулы для повышения прочности связывания с золотой поверхностью. С помощью генной инженерии в структуру рекомбинантного белка А (B5C1) удалось¹⁰² встроить аминокислоты (цистеин), содержащие SH-группы. Полученная прослойка на основе искусственного белка показала более высокую активность связывания по сравнению с обычным белком А и увеличила продолжительность эксплуатации сенсора без снижения активности.

2. Включение в матрицу

Достаточно распространенным приемом иммобилизации белков является включение в гель^{106–108} или в полимер,^{51, 53, 54, 109, 110} который удерживает молекулы за счет физических взаимодействий.

Для формирования полимерной матрицы на поверхность очищенного электрода наносят каплю раствора полимера в органическом растворителе и выдерживают до испарения растворителя. Иммобилизацию антител осуществляют погружением сенсора в раствор, при этом антитела кооптируются в полимерный слой. Такой способ иммобилизации антител использовали³⁵ для определения концентрации HSA. Ранее сенсоры на основе полимерных матриц активно применяли для определения содержания клеток крови: человеческих Т-лимфоцитов,⁵⁴ эритроцитов^{55, 56} и гранулоцитов,⁵³ однако их аналитический сигнал был нестабилен при многократных измерениях. Увеличению прочности связывания биомолекул способствует дополнительное использование глутарового альдегида. При получении рецепторного слоя на электрод кристалла наносят раствор полиэтилен-

амина (PEA)^{70, 111} или полиэтиленimina (PEI)⁷⁰ в метаноле и после удаления растворителя последовательно выдерживают в растворах глутарового альдегида и соответствующих биомолекул (антител или гаптен-белковых конъюгатов). В этом случае селективирующий слой сенсора сохраняет активность до 38 дней.

Более перспективны, но пока редко используются полимерные матрицы, полученные электрополимеризацией⁴⁵ или методом тлеющего разряда,²¹ что исключает применение токсичных растворителей. К такой полимерной пленке белковые молекулы прикрепляются ковалентно.^{21, 45, 112, 113}

Для иммобилизации рецепторных молекул применяются также природные биополимеры (белки, полисахариды). Так, в работе⁷⁰ предложена методика формирования на поверхности электрода сенсора гидрогеля на основе белков (BSA) и антител. Полученный биочувствительный слой обладает высокой чувствительностью и стабильностью.

В последнее время полимерные пленки чаще выступают в роли подложки для повышения адгезии биомолекул, поскольку при гидрофобизации и функционализации поверхности увеличивается прочность закрепления биорецепторного слоя.

3. Химическая сорбция

Этим методом получают насыщенные плотные, трудно разрушаемые слои, устойчивые при анализе жидких сред.¹¹⁴ Такой метод предпочтителен для проточного или проточно-инжекционного анализа. При ковалентной иммобилизации происходит более прочное закрепление биослоя на электроде, что снижает потери при длительном контакте его с жидкостью, обеспечивает более высокую воспроизводимость аналитического сигнала и повышает многократность использования иммобилизованной твердой фазы после регенерации. Химическая сорбция способствует сохранению функциональной активности белков на длительное время (до двух лет). Однако в отдельных случаях при ковалентной иммобилизации из-за действия химических реагентов может снижаться количество активных центров антител.¹¹⁵ При хемосорбции используют преимущественно золотые, реже серебряные электроды (но не алюминиевые или хромовые).

Разновидностью химической сорбции является метод кросс-сшивки, который некоторые авторы выделяют в самостоятельный способ.^{108, 109, 116} Кросс-сшивку осуществляют с помощью различных моно- и гетеробифункциональных реагентов, например гидразид- и сукцинимидсодержащих производных; чаще других используют глутаровый альдегид, который легко вступает в реакцию с аминогруппами, образуя дополнительные метиленовые мостики в молекуле белка.^{68–71, 77, 111, 117–120}

Для осуществления кросс-сшивки применяют различные методики. Например, смесь растворов антител и сшивающего реагента выдерживают непродолжительное время при комнатной температуре, наносят каплю на поверхность электрода кристалла и высушивают.¹¹⁸ Другим приемом является нанесение на электрод капли раствора антител с последующим экспонированием его при пониженной температуре в закрытой камере, насыщенной парами глутарового альдегида.⁷⁰ Принципиальное различие между методиками состоит в разнице действия сшивающего реагента в гомогенной и гетерогенной средах. При смешивании растворов метиленовые мостики образуются во всем объеме жидкости, в то время как пары глутарового альдегида взаимодействуют только с белковыми молекулами, расположенными на поверхности жидкой фазы. Это приводит к сохранению нативной конформации активных центров антител внутри слоя и повышает чувствительность полученного рецепторного покрытия сенсора.

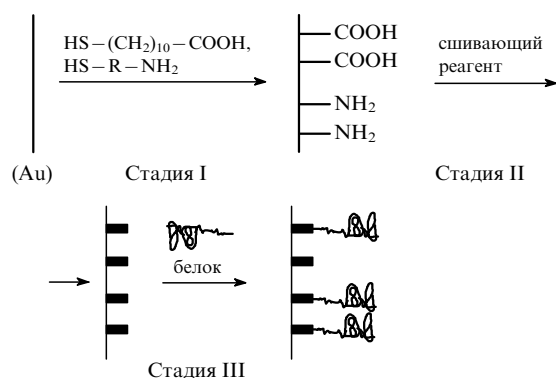


Рис. 7. Схема иммобилизации биомолекул путем химической сорбции.

Стадии иммобилизации: I — активация поверхности металла, II — модифицирование функциональных групп, III — иммобилизация белковой молекулы.

Практически все методы химической иммобилизации осуществляются в три стадии (рис. 7).

Поверхность электрода сенсора активируют нанесением тонкой пленки (подложки), прочно прикрепляющейся к металлу и содержащей активные функциональные группы, необходимые для последующей иммобилизации белковых молекул. Нанесение пленки защищает также поверхность металлического электрода от окисления и преждевременного разрушения в агрессивных средах.

Наибольший интерес представляет метод формирования подложки на основе самособирающихся монослоев (Self-Assembled Monolayers, SAM). К его достоинствам относятся однородность получаемого слоя, равномерное распределение и пространственная доступность активных центров молекул и функциональных групп для связывания с рецепторными молекулами, высокая механическая прочность и химическая устойчивость.^{119, 120} Идеальный монослой представляет собой плотно упакованные нити молекул, прочно связанные с гладкой поверхностью (например, металла).^{121, 122}

При формировании подложки электродов на основе SAM широко используют^{36, 71, 123–127} обработку силоксановыми производными: (γ -аминопропил)триэтоксисиланом (APTS) и (γ -глицидоксипропил)триметоксисиланом (GOPS) с активными амино- и гидроксигруппами соответственно. Модифицированная таким образом поверхность способна непосредственно (в случае GOPS) или после воздействия глутарового альдегида присоединять биомолекулы. Прикрепление Ат к силоксановым пленкам, осуществляемое через амино- и углеводородные группы бифункциональных сшивающих реагентов,¹¹⁶ способствует формированию плотных покрытий ($74–220 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$). Они сохраняют высокий уровень специфического антигенного связывания (от 78 до 92%), что делает возможным широкое применение этого способа иммобилизации.

Другой распространенный способ получения SAM связан с использованием серосодержащих соединений (тиолов и дисульфидов), необратимо адсорбирующихся на золотой поверхности за счет образования координационных связей между атомами серы и золота. Одним из наиболее изученных видов SAM являются пленки на основе алкантиолов. Поскольку монослои ориентируются и стабилизируются за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий между метиленовыми группами, увеличение длины цепи алкантиолов (с числом метиленовых групп свыше 10) приводит к более упорядоченным (по типу кристаллических) структурам монослоев.¹²¹

Аналогичным образом SAM могут быть получены на основе поли-L-лизина,¹²⁸ гидрофобных липидов,^{129, 130} цистамина,¹³¹ цистимина⁷² и *n*-аминофенола,⁴⁵ обеспечивающих поверхность модифицированного слоя аминогруппами; тиопропионовой, липоевой кислот,^{68, 72, 121} меркаптоундеканола¹³² с активными карбоксильными и гидроксильными группами; дитиобис(сукцинимидилпропионата),^{72, 132} содержащего NHS-группы, которые участвуют в непосредственном связывании биомолекул.

Важным требованием, предъявляемым к покрытиям пьезокварцевого сенсора, является их эластичность, поддерживающая конформационную подвижность рецепторных молекул при взаимодействии с определяемыми объектами и способствующая передаче сигнала пьезокварцевому преобразователю. Поэтому на втором этапе хемосорбции активированную поверхность электродов сенсора модифицируют с помощью сшивающих реагентов (глутарового альдегида, бромциана, тиоловых кислот, гидразина, 1,4-диэпоксипентана и др.).¹¹⁵ Для получения более эластичных биослоев, характеризующихся высокой способностью к связыванию лигандов, в качестве сшивающих реагентов применяют высокомолекулярные биополимеры (белок А и белок G,⁷⁰ BSA,⁷⁰ полисахариды — декстран¹³² или окисленный периодатом декстран⁷²). Схема рецепторного слоя с ковалентно связанным декстраном в качестве спейсера приведена на рис. 8.

Углеводные цепочки, ковалентно прикрепленные к защитному покрытию сенсора, обеспечивают конформационную «гибкость» присоединенных к ним биомолекул.^{109, 115} Декстраны, активированные периодатным окислением, используют^{72, 133} для обеспечения плотного трехмерного матрикса с более высокой способностью к связыванию лигандов. Однако недостатками методики являются трудоемкость, длительность и необходимость использования токсичных реагентов.

Биомолекулы (белок А, лектины, комплекс авидин — биотин), используемые для модифицирования поверхности электрода, представляют интерес и в качестве гибких спейсеров. Таким образом, разделение способов иммобилизации на группы весьма условно. Все чаще применяется комбинация различных приемов формирования биорецепторного слоя сенсора. Реакция образования комплекса авидин — биотин характеризуется константой аффинности $10^{15} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$, указывающей на более прочное связывание (в $\sim 10^3$ раз) по сравнению с иммунохимическим. Кроме того, биотину свойственна легкость и высокая степень связывания с антителами без заметного нарушения их активности. Поэтому

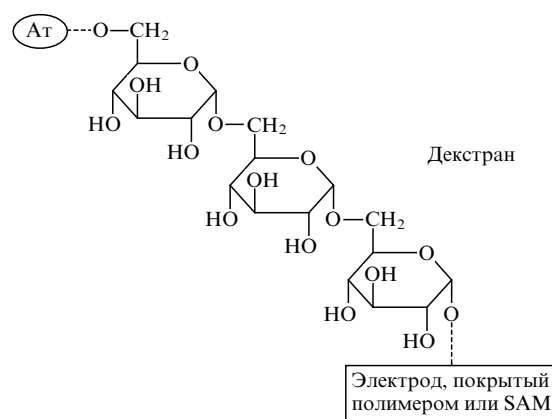


Рис. 8. Схема формирования рецепторного слоя с использованием декстрана в качестве промежуточного слоя между покрытием электрода и биомолекулой.

биорецепторный слой на основе авидин-биотинового комплекса, остающийся стабильным в широком интервале pH при длительном экспонировании в жидкости, широко используется в иммунохимическом анализе.^{57, 132, 134}

На третьей стадии происходит непосредственное ковалентное связывание белковых молекул с реакционными группами спейсеров.

К достоинствам химической сорбции биомолекул следует отнести разнообразие способов иммобилизации и возможность их сочетания, что позволяет разрабатывать стратегический подход для получения селективирующего слоя сенсора с заданными свойствами и создания биораспознающих рецепторов, предназначенных для определения различных аналитов.

Недостатками рассмотренных методов иммобилизации (кросс-сшивки, ковалентного связывания, включения в полимер или прикрепления с помощью биомолекул) остаются относительно большая масса рецепторного слоя и, как следствие, необходимость поэтапного контроля приращения массы, чтобы избежать снижения чувствительности определений и срыва стабильных колебаний пьезосенсора. В отдельных случаях необходимо контролировать активность рецепторного слоя, так как до настоящего времени не предложено универсального способа, одновременно обеспечивающего высокий процент иммобилизации и сохранение активности иммобилизованных антител. Таким образом, для любого конкретного метода оптимальная процедура иммобилизации должна подбираться экспериментально.

V. Условия регенерации биоселективирующих покрытий

Важная отличительная особенность иммуносенсоров состоит в возможности регенерации биослоя после каждого определения, что особенно ценно в проточно-инжекционном анализе большого числа образцов с многократным использованием одного сенсора.

Известно, что реакция образования гетерогенного иммунного комплекса обратима, поэтому суть процесса регенерации сводится к его диссоциации под действием различных факторов, смещающих равновесие в сторону исходных продуктов. Одним из таких факторов является увеличение ионной силы раствора. Так как иммунный комплекс стабилизируется водородными связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, повышение ионной силы раствора вызывает конформационные изменения активного центра молекул антител. При этом аналит десорбируется с биорецепторной поверхности, а у иммобилизованных биомолекул восстанавливается число центров связывания. Обычно используют кислые или щелочные регенерирующие растворы (0.2 М глицин/HCl-буфер (pH 2.5),^{58, 67, 68, 134} 0.2 М глицин,⁶ 0.001 М HCl,^{13, 67, 68} 0.1 М HCl,⁶ 0.5 М H₂Cr₂O₇,¹³ 1 М HCOOH,⁷¹ 0.001–0.1 М NaOH (см.⁶)), а также 30–50%-ный метанол⁶ и денатурирующие реагенты: 6–8 М (NH₄)₂CO (см.⁴⁴) и гуанидин,⁶ действие которых ослабляет взаимодействие активного центра с аналитом. Отмечено, что применение разбавленных растворов не всегда приводит к полной диссоциации иммунных комплексов, а действие более концентрированных реактивов в некоторых случаях снижает чувствительность сенсора в результате повреждения слоя иммобилизованных лигандов. В связи с этим основными требованиями к регенерации биослоя являются восстановление чувствительности до исходного уровня после проведенного измерения и сохранение массы. Описано^{126, 127} применение 0.15–3 М раствора KSCN, эффективность регенерирующего действия которого зависит от иммунореагентов и позволяет использовать биорецепторный слой до 20 раз без снижения активности.

Наряду с химическими реагентами для разрушения иммунного комплекса предлагается использовать избирательные биохимические взаимодействия, приводящие к более прочным (по сравнению с иммунным связыванием) комплексам. Так, для регенерации биослоя возможно применение⁵¹ синтетических пептидов, которые взаимодействуют с сорбированными антигенами (вирусами) и удаляются с рецепторной поверхности. Сенсоры в этом случае сохраняли активность в течение 18 измерительных циклов. Возможно отщепление сорбированного белкового аналита под действием протеиназ. Например, раствор неспецифической протеиназы К в нейтральной среде вызывает гидролитическое отщепление молекул антител, не затрагивая при этом иммобилизованные лиганды биослоя.⁶

Когда при длительном использовании происходит частичное разрушение биослоя и уменьшение его активности (а значит, и снижение воспроизводимости аналитического сигнала), проводят полное очищение металлической поверхности электрода сенсора от нанесенного покрытия. Для этого применяют более концентрированные растворы щелочей и кислот: 0.5–1.2 М NaOH (pH 11–13); 0.5–1.2 М HCl (pH 1–2), а также концентрированную соляную кислоту. Выбор условий полной регенерации поверхности зависит от природы металлического электрода и применяемого способа формирования подложки биослоя. Например, в случае иммобилизации антител с помощью белка А на золотом электроде белковое покрытие полностью удаляется последовательным промыванием сенсора в 1.2 М NaOH, 1.2 М HCl и концентрированной HCl.⁵⁸ Силоксановые пленки легко разрушаются под действием концентрированной HCl. В качестве эффективного регенерирующего реагента используют раствор H₂Cr₂O₇, который за 15 мин обеспечивает полное очищение золотых электродов пьезокварцевых резонаторов от тиоловых покрытий. Для разрушения (γ-аминопропил)триэтоксисилановой подложки необходимо продолжительное выдерживание сенсора в горячем растворе H₂Cr₂O₇.¹³ С поверхности серебряных электродов слой (γ-аминопропил)триэтоксисилана и тетраэтоксисилана легко удаляется 0.1 М раствором HCl (pH 2), которая действует непосредственно на оксидную пленку металла.^{13, 125–127, 135} После промывания и высушивания пьезокварцевый резонатор может быть использован повторно для формирования нового биочувствительного слоя другой специфичности.

Таким образом, выбор условий регенерации биорецепторного слоя и полного очищения поверхности металла электрода резонатора зависит от природы металла и способа иммобилизации биомолекул и требует экспериментального подбора условий. Значительным преимуществом пьезокварцевых иммуносенсоров является возможность осуществления двухуровневой регенерации резонаторов. Это обеспечивает не только многократность, но и многоплановость их использования, что в конечном счете снижает стоимость анализа.

VI. Применение пьезокварцевых иммуносенсоров

Области применения пьезокварцевых иммуносенсоров для определения высоко- и низкомолекулярных аналитов в жидких средах чрезвычайно разнообразны — это биохимические и клинические исследования и анализ, сертификация пищевых продуктов и фармацевтических препаратов, мониторинг объектов окружающей среды и др. (табл. 1).

Большая часть созданных к настоящему времени пьезокварцевых иммуносенсоров предназначена для обнаружения достаточно «крупных» аналитов — белковых молекул, липид-белковых комплексов, нуклеиновых кислот, вирусов, соматических и бактериальных клеток в различных биологи-

Таблица 1. Применение пьезокварцевых иммуносенсоров для клинической диагностики и экологического мониторинга.

Аналит	Вид анализа, способ иммобилизации биомолекул	Предел обнаружения	Ссылки
<i>Микроорганизмы</i>			
Вирус гепатита А, В	Прямое определение, Ат иммобилизованы с помощью белка А	10^5 частиц · мл ⁻¹	136, 137
Вирус гепатита С	РНК вируса гепатита С иммобилизованы через авидин (стрептавидин) на SAM цистамина	—	138
Вирус герпеса	Прямое определение, Ат иммобилизованы с помощью белка А	$5 \cdot 10^4$ частиц · мл ⁻¹	50, 51, 139
Х-Вирус картофеля	Прямое определение, хемосорбция Ат на силексановую подложку	$4 \cdot 10^{-8} - 6 \cdot 10^{-3}$ мг · мл ⁻¹	125
Библиотека фагов	Вытеснительный анализ, биотилированные антигены иммобилизованы с помощью стрептавидина	$(1 - 5) \cdot 10^{11}$ частиц · мл ⁻¹	140
Бактериофаги М13	Прямое определение, антитела иммобилизованы с помощью бифункционального сшивающего реагента	10^9 частиц · мл ⁻¹	25
Бактериофаги	—	$5 \cdot 10^{12}$ частиц · мл ⁻¹	141
<i>Salmonella sp.</i> серогрупп А, В, D	Прямое определение, антитела иммобилизованы с помощью бифункционального сшивающего реагента	$10^5 - 10^8$ клеток · мл ⁻¹	142
<i>Белки</i>			
Иммуноглобулин G (IgG)	Прямое определение, Ат прикреплены к белку А	$10^{-6} - 10^{-2}$ мг · мл ⁻¹	143
IgG человека	Прямое определение, хемосорбция белкового комплекса IgG – Ат на подложку полистирола	5 мкг · мл ⁻¹	144
HSA	Ат иммобилизованы на подложку из этилендиамина, полученную методом тлеющего разряда	16 – 128 мкг · мл ⁻¹	21
	Прямое определение, Ат иммобилизованы на подложку из полистирола	5 – 100 мг · мл ⁻¹	35
Иммуноглобулин М	Прямое определение, хемосорбция Ат на 2-гидроксиэтилметакрилат	10 нг · мл ⁻¹	145
Антитела к вирусу иммунодефицита человека	Прямое определение, иммобилизован синтетический HIV-пептид или рекомбинантные белки	Тесты да/нет	97, 98
Стафилококковый энтеротоксин В (SEB)	Конкурентный способ, Ат адсорбированы на золоте	0.1 мкг · мл ⁻¹	146
Холерный токсин	Сэндвич-способ, усиленный ганглиозид-модифицированными липосомами	10^{-4} нмоль · л ⁻¹	147
С-Реактивный белок	Латексная агглютинация	20 – 66.7 мкг · л ⁻¹	81
Рицин	Прямое определение, Ат иммобилизованы физической сорбцией	0.5 мкг · л ⁻¹	73
C1, C6-Факторы комплемента	Прямое определение, хемосорбция Ат на полиэтилениминовую подложку	0.83 нмоль · л ⁻¹	148, 149
Ферритин	Прямое определение, Ат прикреплены методом кросс-сшивки на цистаминовый монослой	0.1 – 100 нг · мл ⁻¹	131
α-Фетопроtein	Прямое определение, Ат прикреплены методом кросс-сшивки на цистиминовый монослой	1.5 нмоль · л ⁻¹	150
Поверхностный антиген гепатита В	То же	4.7 нмоль · л ⁻¹	151
Иммуноглобулин Е	Прямое определение, физическая сорбция белкового антигена	0 – 300 МЕ · мл ⁻¹ , 0.15 – 17.5 МЕ · мл ⁻¹	67, 68
	Прямое определение, аффинное прикрепление к аптамеру на основе односторонней ДНК	0.05 нмоль · мл ⁻¹	152
Антитела к ДНК	Прямое определение, нативные и денатурированные ДНК иммобилизованы хемосорбцией	0.1 – 25 мкг · мл ⁻¹ 0.03 – 8 МЕ · мл ⁻¹	74
Инсулин	Сэндвич-формат, Ат адсорбированы	0.17 нмоль · л ⁻¹	104
Трансферрин	Агглютинация, усиленная полиэтиленгликолем	2.1 нмоль · л ⁻¹	153
Иммунолипосомы	Конкурентное определение, иммобилизован гаптен	$10^{-8} - 10^{-5}$ моль · л ⁻¹	154
<i>Низкомолекулярные соединения</i>			
Окадаиновая кислота	Конкурентный способ, Ат ковалентно иммобилизованы на полиэтиленаминовую подложку	1.9 мкг · мл ⁻¹	70
	Ат иммобилизованы в гидрогель на основе BSA	50 нг · мл ⁻¹	70
2,4-Дихлорфенокси-уксусная кислота	Конкурентный способ, Ат ковалентно иммобилизованы на аминотиофенольную подложку	0.24 – 0.27 мкг · л ⁻¹	155
Кортизол	Прямое определение, Ат прикреплены к белку А	36 мкг · л ⁻¹ (100 мкмоль · л ⁻¹)	117
3-Индолилуксусная кислота	Конкурентный способ	3 нмоль · л ⁻¹	156
Атразин	То же	0.025 нг · мл ⁻¹ ($5 \cdot 10^{-4}$ мкмоль · л ⁻¹)	58, 59
	Прямое определение	0.01 нг · мл ⁻¹	71

Таблица 1 (окончание).

Аналит	Вид анализа, способ иммобилизации биомолекул	Предел обнаружения	Ссылки
Кокаин	Прямое определение, Ат прикреплены к белку G	33 мкмоль · л ⁻¹	62
	Конкурентный способ, гаптен прикреплен к монослою меркаптоундекановой кислоты	10 ⁻⁴ мкмоль · л ⁻¹	157
β-Эстрадиол	Иммобилизован эстрогеновый элемент, захватывающий рецептор-эстрадиоловый комплекс	8 нмоль · л ⁻¹	158
Атропин	—	0.05 нмоль · л ⁻¹	159
Полиароматические углеводороды	Конкурентный способ, Ат ковалентно иммобилизованы на силоксановую подложку	0.01 мкмоль · л ⁻¹	160, 161
Нонилфенол	То же	0.8 нг · мл ⁻¹	162
Котинин	»	0.1 мкмоль · л ⁻¹	74
Салициловая кислота	»	2.9 мкмоль · л ⁻¹	126
Сульфаметоксазол	»	6 · 10 ⁻⁴ мкмоль · л ⁻¹	127

ческих жидкостях, образцах питьевой воды и пищевых продуктах. Определение концентрации таких объектов с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров оказалось более удобным по сравнению с традиционными микробиологическими или иммунохимическими методами. Пьезоиммуносенсоры используются в клинической диагностике для определения клеток крови (эритроцитов, Т-лимфоцитов, гранулоцитов) и наиболее распространенных болезнетворных бактерий.^{5, 6, 11, 13, 16, 17} Актуальным направлением является создание сенсоров для определения патогенных вирусов (герпеса,^{50, 51, 139} гепатита,^{136–138} иммунодефицита человека^{97, 98} и др.). При проведении скрининга образцов сыворотки крови на содержание вируса иммунодефицита человека отмечена^{67, 68, 97} хорошая корреляция с результатами метода ELISA. Пьезокварцевые иммуносенсоры применяются в ветеринарии для идентификации возбудителей инфекции у животных^{65, 96} и птицы,⁵² а также при оценке качества сельскохозяйственной продукции.^{13, 96}

Важную роль в процессах изменчивости микроорганизмов, происходящих как в организме человека, так и в различных объектах внешней среды, играют бактериофаги. Поэтому в последнее время фаги используются для решения различных задач, в том числе для расшифровки генетического кода человека, в медицинской практике для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, для обнаружения патогенных микробов в объектах окружающей среды. К настоящему времени разработаны высокочувствительные пьезоиммуносенсоры на базе резонаторов с собственной частотой колебаний от 39 до 110 МГц, предназначенные для прямого детектирования M13-фагов в жидких средах,²⁵ а также для скрининга фаговых библиотек.^{140, 141}

Принципиально новые возможности пьезоэлектрических иммуносенсоров продемонстрированы в работе¹⁴². Авторы предложили высокоселективный иммуносенсор на основе моноклональных антител, который позволяет дифференцировать бактерии *Salmonella* на уровне серогрупп — A, B и D. Разработанные сенсоры проявляли исключительную специфичность по способности распознавать антигены, структура которых различается на уровне иммунодоминантных моносахаридов (оптических изомеров 3,6-дидезоксигексозы: паратозы, абеквозы и тивелозы). Полученные данные открывают перспективу использования гравиметрических иммуносенсоров для подтверждения результатов структурных исследований углеводсодержащих биополимеров, а также при разработке диагностикомов.

Пьезоиммуносенсоры применяют для определения белковых молекул, например антител в сыворотке крови — IgG, IgM, IgE. Для проведения эффективного лечения аллергических и аутоиммунных заболеваний необходимо осуществлять контроль сыворотки крови больных на содержание

иммуноглобулинов (IgE)^{67, 68, 152} и антител к ДНК. Рецепторное покрытие на основе нативных и денатурированных молекул ДНК использовано⁷⁴ для прямого определения антител к ДНК в проточно-инжекционном режиме при проведении анализа сыворотки крови больных с симптомами системной красной волчанки.

С помощью пьезоиммуносенсоров выявляют широкий круг клинически важных аналитов, среди которых белки-маркеры опухолевых заболеваний, например α-фетопротеин¹⁵⁰ и ферритин.¹³¹ К сожалению, предложенный сенсор невозможно использовать для анализа образцов крови людей из-за узкого диапазона определяемых концентраций ферритина. Необходимо проведение дальнейших исследований для расширения диапазона определяемых содержаний, поскольку концентрация этого белка в крови здоровых людей в норме составляет 90 и 200 нг · мл⁻¹ у женщин и мужчин соответственно.

Пьезосенсоры на основе ДНК применяют при изучении гибридизации нуклеиновых кислот.^{163–165} Недавно гравиметрический иммуносенсор предложен^{166, 167} в качестве подходящего инструмента для оценки генетически модифицированных организмов.

В качестве рецепторных покрытий используют не только белковые молекулы и ДНК, но и углевод-липидные биополимеры — липополисахариды (ЛПС). Биологически активные ЛПС, локализованные на внешней мембране клеточной стенки грамотрицательных бактерий, отвечают за проявление О-антигенной специфичности и токсичности микроорганизмов. Предложен¹³⁵ способ исследования взаимодействия иммобилизованных бактериальных эндотоксинов (ЛПС) с синтетическими ЛПС-связывающими пептидами. Полученные результаты показывают возможность использования гравиметрических иммуносенсоров с иммобилизованными ЛПС для оценки эффективности противотоксичных препаратов (антидотов).

Расширение вариантов иммуноанализа с пьезокварцевыми сенсорами по конкурентной схеме вызвало появление новых работ по определению низкомолекулярных веществ — лекарственных препаратов, гормонов, алкалоидов, пестицидов и их метаболитов, экотоксикантов, витаминов и т.д.^{168, 169}

Одним из широко распространенных классов низкомолекулярных токсикантов, контроль за содержанием остаточных количеств которых осуществляют с помощью пьезоиммуносенсоров, являются пестициды.⁶

Поскольку ветеринарные антибиотики используются так же широко, как пестициды, а накопление лекарств и их токсичных метаболитов в сельскохозяйственных продуктах представляет потенциальную угрозу для здоровья людей, применение пьезоиммуносенсоров для осуществления контроля за содержанием токсичных веществ в продуктах

питания (молоке, мясе, яйцах) и объектах окружающей среды (сточных водах; реках, ручьях; грунтовых водах) представляет актуальную задачу. Разработаны^{127, 170} иммуносенсоры для определения противомикробных сульфопрепаратов в водных растворах и в молоке. Кроме того, с помощью пьезосенсоров возможно проведение экспертизы лекарственных препаратов на выявление фальсифицированной продукции.

Разработан⁷⁴ гравиметрический иммуносенсор, позволяющий определять в моче концентрацию котинина (метаболита никотина, своеобразного маркера, полезного для определения статуса курильщиков при проведении социологических исследований). Обследование мочи различных пациентов показало, что содержание котинина для активных курильщиков составляет 4–6 мг·л⁻¹; а для некурящих людей — 0.5–0.7 мг·л⁻¹. Чувствительность пьезосенсора сопоставима с чувствительностью поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

Установлены оперативные характеристики пьезокварцевых иммуносенсоров, предназначенных для определения гидрофобных экотоксикантов (например, полиароматических углеводородов^{160, 161}), которые улучшаются в присутствии органических растворителей.^{6, 155}

Широкое применение нонилфенолэтоксилатов в качестве детергентов и эмульгаторов при производстве моющих средств, красителей, некоторых гербицидов и дубильных веществ привело к загрязнению окружающей среды продуктами их деградации. Особенно опасен нонилфенол, обладающий исключительно высокой токсичностью, канцерогенной, эстрогенной и другими видами физиологической активности. Для осуществления контроля сточных вод предприятий и речных водоемов предложена¹⁶² методика проточно-инжекционного определения нонилфенола в воде.

Показана⁷⁰ возможность осуществления экологического контроля за уровнем токсикантов (например, окарбиновой кислоты), продуцируемых некоторыми видами водорослей.

Непрерывно растущее число публикаций свидетельствует о стремлении исследователей к расширению областей применения пьезоэлектрических иммуносенсоров. Следует отметить, что с помощью проточных иммуносенсоров можно определять не только концентрацию различных по массе аналитов, но и изменение вязкоупругих свойств пограничного слоя при протекании иммунных реакций в растворах;⁷⁵ а также регистрировать динамику процесса биохимического взаимодействия в режиме реального времени. Эта уникальная особенность пьезосенсоров обеспечивает возможность проведения кинетических исследований различных аффинных взаимодействий (антиген — антитело, белок — нуклеиновая кислота, гибридизация комплементарных нитей ДНК, рецептор — лиганд и т.д.). Исследования в этом направлении представлены в работах^{6, 15, 126}. Применение пьезоиммуносенсоров перспективно при количественной оценке перекрестных реакций между структурно родственными антигенами и антителами,¹⁷⁰ гибридизации ДНК,^{163–165} эпителиальном картировании.¹⁷¹

Комбинирование метода пьезокварцевого микровзвешивания с измерением импеданса позволяет оценивать вязкоупругие свойства пленок и жидкостей, контактирующих с поверхностью пьезокварцевого кристалла. К пьезокварцевому кристаллу и вспомогательному электроду прикладывается переменное напряжение с частотой, близкой к собственной частоте резонатора. При этом регистрируются потенциал и ток, проходящий через кристалл, отношение которых (импеданс), позволяет осуществлять мониторинг деградации тонких полимерных пленок в присутствии биомолекул, конформационные изменения, фазовые переходы, набухание и иммунохимическое взаимодействие в режиме реального времени.^{22, 172}

Кроме того, возможность сочетания пьезокварцевого микровзвешивания с другими методами, например оптическими или электрохимическими, поверхностным плазмонным резонансом, атомно-силовой микроскопией, будет способствовать расширению наших представлений о реальных процессах, происходящих при биохимических взаимодействиях на клеточном уровне.

VII. Заключение

Анализ публикаций за последние десять лет показывает, что новое научное направление, связанное с разработкой и применением пьезокварцевых иммуносенсоров в биоаналитической химии, вызывает растущий интерес ученых во всем мире.

Относительно низкая стоимость в сочетании с высокой чувствительностью и селективностью, а также возможность регенерации делают пьезокварцевые иммуносенсоры реальной альтернативой существующим оптическим, электрохимическим и другим сенсорам при проведении рутинных анализов. В перспективе пьезокварцевые иммуносенсоры должны более широко использоваться в качестве тест-средств и детекторов для проточно-инжекционного определения не только различных по массе аналитов, но и при распознавании генетически модифицированных продуктов, оценке динамики иммунохимических взаимодействий, роста микробных популяций, изменения вязкоупругих свойств исследуемых жидких сред. Создание диагностикумов на базе пьезоиммуносенсоров, позволяющих выявлять различные инфекционные, аутоиммунные, онкологические заболевания на ранних стадиях, остается актуальной проблемой медицины и ветеринарии. Особенно перспективно использование пьезоиммуносенсоров для обнаружения наркотиков и проведения антидопингового контроля, который можно осуществлять по тестированию образцов мочи, слюны и других биологических жидкостей на содержание алкалоидов, гормональных препаратов и других лекарственных веществ, принимаемых не по назначению.

В нашей стране исследования, связанные с разработкой массочувствительных иммуносенсоров, только начинаются. Авторы надеются, что представленный материал покажет широкие перспективы использования пьезоиммуносенсоров, значительным преимуществом которых является возможность осуществления оценки молекулярных взаимодействий в реальном времени без каких-либо меток или сложной пробоподготовки анализируемых образцов.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-03-32226).

Литература

1. A.J.Killard, B.Deasy, R.O'Kennedy, M.R.Smyth. *Trends Anal. Chem.*, **14**, 257 (1995)
2. V.Hock. *Anal. Chim. Acta*, **347**, 177 (1997)
3. Л.М.Дорожкин, И.А.Розанов. *Журн. аналит. химии*, **56**, 455 (2001)
4. J.Rickert, G.L.Hayward, B.A.Cavic-Vlasak, M.Thompson, W.Gopel. In *Sensors Update 5*. (Eds H.Baltes, W.Gopel, J.Hesse). Wiley-VCH, Weinheim, 1999. P. 105
5. M.Thompson, C.L.Arthur, G.K.Dhaliwal. *Anal. Chem.*, **58**, 1206 (1986)
6. P.Skládal, J.Horacek, M.Malina. In *Direct Piezoelectric Immunosensors for Pesticides*. (Eds D.P.Nikolelis, U.J.Krull, J.Wang, M.Mascini). Kluwer Academic, Amsterdam, 1998. P. 145
7. P.Skládal. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 257 (1999)
8. Э.П.Медянцева, Е.В.Халдеева, Г.К.Будников. *Журн. аналит. химии*, **56**, 1015 (2001)

9. M.Minunni, M.Mascini, G.G.Guilbault, B.Hock. *Anal. Lett.*, **28**, 749 (1995)
10. R.L.Bunde, E.J.Jarvi, J.J.Rosentreter. *Talanta*, **46**, 1223 (1998)
11. B.A.Cavic, G.L.Hayward, M.Thompson. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **124**, 1405 (1999)
12. C.K.O'Sullivan, G.G.Guilbault. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 663 (1999)
13. X.Su, F.T.Chew, S.F.Y.Li. *Anal. Sci.*, **16**, 107 (2000)
14. P.B.Luppa, L.J.Sokoll, D.W.Chain. *Clin. Chim. Acta*, **314**, 1 (2001)
15. K.Busch, R.Tampe. *Rev. Mol. Biotechnol.*, **82**, 3 (2001)
16. P.Skladal. *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**, 491 (2003)
17. K.Yokoyama, K.Ikebukuro, E.Tamiya, I.Karube, N.Ichiki, Y.Arikawa. *Anal. Chim. Acta*, **304**, 139 (1995)
18. C.Steegborn, P.Skladal. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 19 (1997)
19. В.В.Малов. *Пьезорезонансные датчики*. Энергоатомиздат, Москва, 1989
20. K.Bizet, C.Gabrielli, H.Perrot. *Analysis*, **27**, 609 (1999)
21. R.Saber, S.Mutlu, E.Piskin. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 727 (2002)
22. K.Bizet, C.Gabrielli, H.Perrot, J.Therasse. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 259 (1998)
23. Z.Lin, C.M.Yip, I.S.Joseph, M.D.Ward. *Anal. Chem.*, **65**, 1546 (1993)
24. E.Uttenthaler, M.Schraml, S.Drost. In *Proceedings of the 6th World Congress on Biosensors*. San Diego, 2000. P. 147
25. E.Uttenthaler, M.Schraml, J.Mandel, S.Drost. *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 735 (2001)
26. G.Z.Sauerbrey. *Z. Phys.*, **155**, 206 (1959)
27. A.Shons, F.Dorman, J.Najarian. *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 565 (1972)
28. J.Ngeh-Ngwainbi, P.H.Foley, S.S.Kuan, G.G.Guilbault. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5444 (1986)
29. J.F.Alder, J.J.Calumn. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **108**, 1169 (1983)
30. G.G.Guilbault, J.M.Jordan. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **19**, 1 (1988)
31. J.Luong, G.Guilbault. In *Biosensors: Principles and Applications*. (Eds L.J.Blum, P.R.Coulet). Marcel Dekker, New York, 1991. P. 85
32. A.A.Suleiman, G.Guilbault. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **119**, 2279 (1994)
33. L.V.Rajakovic, B.A.Cavic-Vlasak, V.Ghaemmaghami, K.M.R.Kallury, A.L.Kipling, M.Thompson. *Anal. Chim. Acta*, **217**, 111 (1989)
34. J.J.McCallum. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **114**, 1173 (1989)
35. X.Su, C.Dai, J.Zhan, S.J.O'Shea. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 111 (2002)
36. C.Barnes. *Sens. Actuators, A*, **29**, 59 (1991)
37. C.Barnes, C.D'Silva, J.P.Jones, T.J.Levis. *Sens. Actuators, B*, **7**, 347 (1992)
38. M.Muratsugu, F.Ohta, Y.Miya, T.Hosokawa, S.Kurasawa, N.Kamo, H.Ikeda. *Anal. Chem.*, **65**, 2933 (1993)
39. M.Minunni, P.Skladal, M.Mascini. *Anal. Lett.*, **27**, 1475 (1994)
40. Пат. 4236893 США; *Chem. Abstr.*, **94**, 119352 (1981)
41. Пат. 4242096 США (1980)
42. H.Muramatsu, K.Kajiwara, E.Tamiya, I.Karube. *Anal. Chim. Acta*, **188**, 257 (1986)
43. H.Muramatsu, Y.Watanabe, M.Hikuma, T.Akata, I.Kubo, E.Tamiya, I.Karube. *Anal. Lett.*, **22**, 2155 (1989)
44. E.Prusak-Sochaczewski, J.H.T.Loung, G.G.Guilbault. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 173 (1990)
45. S.H.Si, F.L.Ren, W.Cheng, S.Z.Yao. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 1101 (1997)
46. M.B.Jacobs, R.M.Carter, G.J.Lubrano, G.G.Guilbault. *Am. Lab. (Shelton, Conn.)*, **27**, 26 (1995)
47. M.Minunni, M.Mascini, R.M.Carter, M.B.Jacobs, G.J.Lubrano, G.G.Guilbault. *Anal. Chim. Acta*, **325**, 169 (1996)
48. R.M.Carter, J.J.Mekalanos, M.B.Jacobs, G.J.Lubrano, G.G.Guilbault. *J. Immunol. Methods*, **187**, 121 (1995)
49. B.König, M.Grätzel. *Anal. Lett.*, **26**, 1567 (1993)
50. S.Zupan, B.Filipic, M.Babic. *Acta Pharm.*, **42**, 361 (1992)
51. B.König, M.Grätzel. *Anal. Chem.*, **66**, 341 (1994)
52. Y.S.Fung, S.H.Si, D.R.Zhu. *Talanta*, **51**, 151 (2000)
53. B.König, M.Grätzel. *Anal. Lett.*, **26**, 2313 (1993)
54. B.König, M.Grätzel. *Anal. Chim. Acta*, **281**, 13 (1993)
55. B.König, M.Grätzel. *Anal. Chim. Acta*, **276**, 329 (1993)
56. B.König, M.Grätzel. *Anal. Chim. Acta*, **280**, 37 (1993)
57. E.Prusak-Sochaczewski, J.Luong. *Anal. Lett.*, **23**, 401 (1990)
58. G.G.Guilbault, B.Hock, R.Schmid. *Biosens. Bioelectron.*, **7**, 411 (1992)
59. M.Minunni, P.Skladal, M.Mascini. *Life Chem. Rep.*, **11**, 391 (1994)
60. E.Prusak-Sochaczewski, J.Luong. *Anal. Lett.*, **23**, 183 (1990)
61. C.R.Suri, P.K.Jain, G.C.Mishra. *J. Biotechnol.*, **39**, 27 (1995)
62. B.S.Atili, A.A.Suleiman. *Microchem. J.*, **54**, 174 (1996)
63. C.R.Suri, M.Raje, G.C.Mishra. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 325 (1994)
64. X.Chu, Z.H.Lin, G.L.Shen, R.Q.Yu. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **120**, 2829 (1995)
65. X.D.Su, S.F.Y.Li, W.Liu, J.Kwang. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **125**, 725 (2000)
66. X.D.Su, S.Low, J.Kwang, V.H.T.Chew, S.F.Y.Li. *Sens. Actuators, B*, **75**, 29 (2001)
67. X.D.Su, F.T.Chew, S.F.Y.Li. *Anal. Biochem.*, **273**, 66 (1999)
68. X.D.Su, F.T.Chew, S.F.Y.Li. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 629 (2000)
69. Е.Н.Калмыкова, М.В.Струкова, О.И.Перетягина, С.А.Еремин, Т.Н.Ермолаева. В кн. *Тест-методы химического анализа. (Тезисы докладов Всероссийского симпозиума)*. Москва, 2001. С. 66
70. A.H.J.Tang, M.Pravda, G.G.Guilbault, S.Piletsky, A.P.F.Turner. *Anal. Chim. Acta*, **471**, 33 (2002)
71. J.Pribyl, M.Hepel, J.Halamek, P.Skladal. *Sens. Actuators, B*, **91**, 333 (2003)
72. Y.-C.Liu, C.-M.Wang, K.-P.Hsiung. *Anal. Biochem.*, **299**, 130 (2001)
73. R.M.Carter, M.B.Jacobs, G.J.Lubrano, G.G.Guilbault. *Anal. Lett.*, **28**, 1379 (1995)
74. Е.Н.Калмыкова, Т.Н.Ермолаева, С.А.Еремин. *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*, **43**, 391 (2002)
75. J.Halamek, M.Hepel, P.Skladal. *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 253 (2001)
76. Пат. 4314821 США (1982); *Chem. Abstr.*, **96**, 139258 (1982)
77. L.Alfonta, I.Willner. *Anal. Chem.*, **73**, 5287 (2001)
78. S.P.Sakti, P.Hauptmann, B.Zimmermann, F.Buhling, S.Ansorge. *Sens. Actuators, B*, **78**, 257 (2001)
79. L.L.Bao, L.Deng, L.H.Nie, S.Z.Yao, W.Z.Wei. *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 1193 (1996)
80. L.L.Bao, L.Deng, L.H.Nie, S.Z.Yao, W.Z.Wei. *Talanta*, **43**, 675 (1996)
81. H.Aizawa, S.Kurasawa, K.Ogawa, M.Yoshimoto, J.Miyake, H.Tanaka. *Sens. Actuators, B*, **76**, 173 (2001)
82. Пат. США 4847193; *Chem. Abstr.*, **111**, 150067 (1989)
83. Пат. США 5501986 (1996)
84. X.T.Mo, Y.P.Zhou, H.Lei, L.Deng. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 583 (2002)
85. J.S.Bovenizer, M.B.Jacobs, C.K.O'Sullivan, G.G.Guilbault. *Anal. Lett.*, **31**, 1287 (1998)
86. S.Babacan, P.Privarnik, S.Letcher, A.G.Rand. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 615 (2000)
87. C.Barnes, C.D'Silva, J.P.Jones, T.J.Lewis. *Sens. Actuators, B*, **3**, 295 (1991)
88. L.Chen, X.He, X.Hu, H.Hu. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **12**, 1787 (1999)
89. M.Horisberger, M.Vauthey. *Histochemistry*, **80**, 13 (1984)
90. J.F.Kennedy, J.M.S.Cabral. In *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*. (Ed. W.H.Scouten). Wiley, New York, 1983. P. 253
91. R.Ulbrich, R.Golbik, A.Schellenberger. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 280 (1991)
92. B.W.Morrissey, C.C.Han. *J. Colloid Interface Sci.*, **65**, 423 (1978)
93. J.Davies, A.C.Dawkes, A.G.Haymes, C.J.Roberts, R.F.Sunderland, M.J.Wilkins, C.M.Davies, S.J.B.Tendler, D.E.Jackson, J.C.Edwards. *J. Immunol. Methods*, **167**, 263 (1994)
94. J.E.Bulter, P.Navarro, J.Sun. *Immunol. Invest.*, **26**, 39 (1997)

95. *Иммобилизованные ферменты. Т. 1.* (Под ред. И.В.Березина, В.К.Антонова, К.Мартиника). Изд-во МГУ, Москва, 1976. С. 266
96. E.Uttenthaler, C.Koeslinger, S.Drost. *Anal. Chim. Acta*, **362**, 91 (1998)
97. C.Kösslinger, S.Drost, F.Aberl, H.Wolf. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **349**, 349 (1994)
98. F.Aberl, H.Wolf, C.Koeslinger, S.Drost, P.Woias, S.Koch. *Sens. Actuators, B*, **18**, 271 (1994)
99. R.J.Pei, J.M.Hu, Y.Hu, Y.E.Zeng. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, **19**, 363 (1998)
100. R.J.Pei, J.M.Hu, Y.Hu, Y.E.Zeng. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **71**, 59 (1998)
101. K.Davis, T.Leary. *Anal. Chem.*, **61**, 1227 (1989)
102. X.Ren, E.Kobatake, M.Aizawa. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **125**, 669 (2000)
103. D.A.Palmer, M.T.French, J.N.Miller. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **119**, 2769 (1994)
104. S.Saha, M.Raje, C.R.Suri. *Biotechnol. Lett.*, **24**, 711 (2002)
105. S.Babacan, P.Pivarmik, S.Letcher, A.Rand. *J. Food Sci.*, **67**, 314 (2002)
106. S.J.Lasky, D.A.Buttry. *Am. Biotechnol. Lab.*, **8**, 8 (1990)
107. S.J.Lasky, D.A.Buttry. In *Chemical Sensors and Microinstrumentation*. American Chemical Society, Washington, DC, 1989. P. 237
108. *Химия привитых поверхностных соединений.* (Под ред. Г.В.Лисичкина). Физматлит, Москва, 2003. С. 592
109. G.G.Guilbault, J.H.T.Loung, E.Prusak-Sochaczewski. *Biotechnology*, **7**, 349 (1989)
110. G.Harsanyi. *Sens. Rev.*, **20**, 98 (2000)
111. C.Zhang, G.Feng, Z.Gao. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 1219 (1997)
112. F.J.He, L.D.Zhang, J.W.Zhao, B.L.Hu, J.T.Lei. *Sens. Actuators, B*, **85**, 284 (2002)
113. X.Chu, J.H.Jiang, G.L.Shen, R.Q.Yu. *Anal. Chim. Acta*, **336**, 185 (1996)
114. D.Leckband, R.Langer. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 227 (1991)
115. N.Barie, M.Rapp. *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 979 (2001)
116. L.C.Sriver-Like, B.Donner, R.Edelstein, K.Breslin, S.K.Bhatia, F.S.Ligler. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 1101 (1997)
117. B.S.Atili, A.A.Suleiman. *Anal. Lett.*, **28**, 2149 (1995)
118. I.-S.Park, N.Kim. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 1091 (1998)
119. I.-S.Park, W.-Y.Kim, N.Kim. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 167 (2000)
120. S.L.Zhang, T.Z.Peng, C.F.Yang. *J. Electroanal. Chem.*, **522**, 152 (2002)
121. T.Wink, S.Y.Zuilen, A.Bult, W.P.Bennekom. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **122**, 43R (1977)
122. R.Paolesse, C.D.Natabe, A.Mecagnano, F.Davide, T.Boschi, A.D'Amoco. *Sens. Actuators, B*, **47**, 76 (1998)
123. P.Skladal, M.Minunni, M.Mascini, V.Kolar, M.Franek. *J. Immunol. Methods*, **176**, 117 (1994)
124. P.Skladal, J.Horacek. *Anal. Lett.*, **32**, 1519 (1999)
125. А.Ю.Фадеев, А.А.Ельцов, Ю.К.Алешин, С.И.Мальшенко, Г.В.Лисичкин. *Журн. физ. химии*, **68**, 2071 (1994)
126. Е.Н.Калмыкова, Е.В.Мелихова, Е.С.Дергунова, С.А.Еремин, Т.Н.Ермолаева. *Сорбц. хроматогр. процессы*, **4**, 597 (2004)
127. Е.Н.Калмыкова, Е.В.Мелихова, С.А.Еремин, Т.Н.Ермолаева. *Антибиотики и химиотерапия*, **49**, 8 (2004)
128. W.Schramm, S.-H.Paek, G.Voss. *ImmunoMethods*, **3**, 93 (1993)
129. P.N.Bartlett, K.Brace, E.J.Calvo, R.Etchenique. *J. Mater. Chem.*, **10**, 149 (2000)
130. K.Yano, U.T.Bornscheuer, R.D.Schmid, H.Yoshitake, H.-S.Ji, K.Ikebukuro, Y.Masuda, I.Karube. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 397 (1998)
131. S.-F.Chou, W.-L.Hsu, J.-M.Hwang, C.-Y.Chen. *Anal. Chim. Acta*, **453**, 181 (2002)
132. S.Storri, T.Santoni, M.Minunni, M.Mascini. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 347 (1998)
133. S.Toyama, A.Shoji, Y.Yoshida, S.Yamauchi, Y.Ikariyama. *Sens. Actuators, B*, **52**, 65 (1998)
134. A.Dupont-Filliard, M.Billon, S.Guillerez, G.Bigan. *Talanta*, **55**, 981 (2001)
135. H.-C.Chang, C.-C.Yang, T.-M.Yeh. *Anal. Chim. Acta*, **340**, 49 (1997)
136. B.Konig, M.Gratzel. *Anal. Chim. Acta*, **309**, 19 (1995)
137. X.D.Zhou, L.J.Liu, M.Hu, L.L.Wang, J.M.Hu. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27**, 341 (2002)
138. P.Skladal, C.S.Riccardi, H.Yamanaka, P.L.Costa. *J. Virol. Methods*, **117**, 145 (2004)
139. S.Susmel, C.K.O'Sullivan, G.G.Guilbault. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 639 (2000)
140. A.Hengerer, J.Decer, E.Prohaska, S.Hauck, C.Koeslinger, H.Holf. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 139 (1999)
141. A.J.Cann. In *Principles of Molecular Virology*. Academic Press, New York, 1993. P. 666
142. Y.Y.Wong, S.P.Ng, M.H.Ng, S.H.Si, S.Z.Yao, Y.S.Fung. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 676 (2002)
143. H.Muramatsu, J.M.Dicks, E.Tamiya, I.Karube. *Anal. Chem.*, **59**, 2760 (1987)
144. Y.Liu, X.Yu, R.Zhao, D.-H.Shangguan, Z.Bo, G.Liu. *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 9 (2003)
145. X.Chu, G.L.Shen, F.Y.Hie, R.Q.Yu. *Anal. Lett.*, **30**, 1783 (1997)
146. J.L.N.Harteveld, M.S.Nieuwenhuizen, E.R.J.Wils. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 661 (1997)
147. L.Alfonta, I.Wilner. *Anal. Chem.*, **72**, 5287 (2001)
148. L.Liu, J.M.Hu, L.L.Wang, L.J.Liu, H.D.Zhou. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **369**, 483 (2001)
149. J.M.Hu, L.J.Liu, B.Danielsson, X.D.Zhou, L.L.Wang. *Anal. Chim. Acta*, **423**, 215 (2000)
150. S.-F.Chou, W.L.Hsu, J.M.Hwang, C.Y.Chen. *Clin. Chem. (Washington, D.C.)*, **48**, 913 (2002)
151. Z.Z.Chen, K.M.Wang, Y.K.Chen, D.Xiao, X.H.Yang, G.Q.Shao. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, **23**, 1044 (2002)
152. M.Liss, B.Petersen, H.Wolf, E.Prohaska. *Anal. Chem.*, **74**, 4488 (2000)
153. Z.Y.Wu, G.L.Shen, L.J.Xie, R.Q.Yu. *Sens. Actuators, B*, **71**, 99 (2000)
154. K.Yun, E.Kobatake, T.Haruyama, M.L.Laukkanen, K.Keinanen, M.Aizawa. *Anal. Chem.*, **70**, 260 (1998)
155. J.Horáček, P.Skladal. *Anal. Chim. Acta*, **347**, 43 (1997)
156. J.Li, Z.Y.Wu, L.T.Xiao, G.M.Zeng, G.H.Hung, G.L.Shen, R.Q.Yu. *Anal. Sci.*, **18**, 403 (2002)
157. J.Halamek, A.Makower, P.Skladal, F.W.Scheller. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 1045 (2002)
158. Z.H.Mo, X.H.Long, W.L.Fu. *Anal. Commun.*, **36**, 281 (1999)
159. W.Z.Wei, C.W.Hu, W.H.Zhu, S.Z.Yao. *Anal. Lett.*, **26**, 2371 (1993)
160. M.Liu, Q.X.Li, G.A.Rechnitz. *Anal. Chim. Acta*, **387**, 29 (1999)
161. K.A.Fährnich, M.Pravda, G.Guilbault. *Anal. Lett.*, **35**, 1269 (2002)
162. Е.Н.Калмыкова, Е.С.Дергунова, С.А.Еремин, Т.Н.Ермолаева. В кн. *Аналитика России. (Тезисы докладов Всероссийской конференции)*. Москва, 2004. С. 86
163. N.C.Fawcett, J.A.Evans. *Anal. Lett.*, **21**, 1099 (1988)
164. S.R.Micklsen. *Electroanalysis*, **8**, 15 (1996)
165. S.Tombelli, G.Marrazza, M.Mascini. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **80**, 87 (2001)
166. M.Minunni, S.Tombelli, E.Mariotti, M.Mascini. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **369**, 589 (2001)
167. M.Minunni, S.Tombelli, S.Pratesi, M.Mascini, P.Piatti, P.Bogani, M.Buiatti. *Anal. Lett.*, **34**, 825 (2001)
168. P.W.Walton, M.E.Bulter, M.R.O'Flaherty. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 44 (1991)
169. G.Y.Zhu, Y.Wang. *Fenxi Huaxue*, **23**, 1095 (1995)
170. L.Nie, T.Wang, S.Yao. *Talanta*, **39**, 155 (1992)
171. S.Dorsch, B.Kauffman, U.Schaible, E.Prohaska, H.Wolf, S.Modrow. *J. Gen. Virol.*, **82**, 191 (2001)
172. M.Huang, D.Shen, L.M.Chow, M.Yang. *Sens. Actuators, B*, **72**, 21 (2001)

PIEZOELECTRIC IMMUNOSENSORS. ANALYTICAL POTENTIAL AND PROSPECTS**T.N.Ermolaeva, E.N.Kalmykova***Lipetsk State Technical University**30, Ul. Moskovskaya, 398060 Lipetsk, Russian Federation, Fax +7(4742)31-0473*

The state-of-the-art research dealing with the design of piezoelectric immunosensors is analysed. The conditions of analyses carried out by means of these sensors; the types of immunochemical reactions detected by piezogravimetric sensors; and the ways of immobilisation of bioreceptor molecules on the electrode surface of piezoelectric resonators are outlined. The attention is focused on the practical use of the designed sensors for determination of microorganisms and low- and high-molecular mass compounds in liquid media.

Bibliography — 172 references.

Received 31st March 2005