



УДК 606:577.2/3: 616-091.3

Підготовка компонентів селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора для індикації *Pseudomonas aeruginosa*

О.Ю. Новгородова, М.Ф. Стародуб, В.О. Ушкалов
oleksandra_n@yahoo.com, nikstarodub@yahoo.com, ushkalov63@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

У статті представлено результати досліджень щодо отримання специфічних компонентів підготовки селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора для подальшого розроблення імунобіосенсорної тест-системи для експрес-індикації бактерій *Pseudomonas aeruginosa* з метою її детекції в біологічному матеріалі та в об'єктах довкілля. Авторами було отримано специфічні антисироватки та імуноглобуліни до *P. aeruginosa*. Отримані компоненти модифікації поверхні було протестовано на активність та специфічність за допомогою аналітичного приладу імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу «Плазмон-6». На трансдюсерній поверхні імунного біосенсора іммобілізували специфічні антитіла, що взаємодіяли з клітинними антигенами, в результаті чого реєстрували зсув величини резонансного кута. З відгуку імуносенсора видно, що діагностична система працює із концентрацією IgG 1 мг/мл, робочий титр 1:7 в поліклональних антитілах проти *P. aeruginosa*. Отримані специфічні антисироватки та імуноглобуліни можуть бути використані, як компоненти підготовки селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора.

Ключові слова: бактерії, тест-система, імуноглобулін, специфічні сироватки

Подготовка компонентов селективной поверхности трансдюсера иммунного биосенсора для индикации *Pseudomonas aeruginosa*

А.Ю. Новгородова, М.Ф. Стародуб, В.А. Ушкалов
oleksandra_n@yahoo.com, nikstarodub@yahoo.com, ushkalov63@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Обороны, 15, г. Киев, 03041, Украина

В статье представлены результаты исследований по получению специфических компонентов подготовки селективной поверхности трансдюсера иммунного биосенсора для дальнейшей разработки иммунобиосенсорной тест-системы для экспрес-индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* с целью ее детекции в биологическом материале и в объектах окружающей среды. Авторами было получено специфические антисыворотки и иммуноглобулины к *P. aeruginosa*. Полученные компоненты модификации поверхности были протестированы на активность и специфичность с помощью аналитического прибора иммуносенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса «Плазмон-6». На трансдюсерной поверхности иммунного биосенсора иммобилизовали специфические антитела, которые взаимодействовали с клеточными антигенами, в результате чего регистрировали смещение величины резонансного угла. Исходя из отклика иммуносенсора видно, что диагностическая система работает с концентрацией IgG 1 мг/мл, рабочий титр 1:7 в поликлональных антителах против *P. aeruginosa*. Полученные специфические антисыворотки и иммуноглобулины могут быть использованы, как компоненты подготовки селективной поверхности трансдюсера иммунного биосенсора.

Ключевые слова: бактерии, тест-система, иммуноглобулин, специфические сыворотки.

Citation:

Novgorodova, O.Ju., Starodub, M.F., Ushkalov, V.O. (2017). Preparation of components for selective surface of immune biosensor for inditation *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(77), 190–193.

Preparation of components for selective surface of immune biosensor for indication *Pseudomonas aeruginosa*

O.Ju. Novgorodova, M.F. Starodub, V.O. Ushkalov
oleksandra_n@yahoo.com, nikstarodub@yahoo.com, ushkalov63@gmail.com

National university of life and environmental sciences of Ukraine,
Heroyiv Oborony Str., 11, Kyiv, 03041, Ukraine

The article presents the results of research to obtain specific components of the preparation selective biosensor surface for further development the immune biosensor test-system for the express – indication of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and their detection in biological material and in the environment. Specific antiserum and immunoglobulins to *P. aeruginosa* were obtained by authors. The resulting surface modification components for activity and specificity of the specific components were tested using analytical device immunosensor «Plasmon-6», based on surface plasmon resonance. Biosensors are defined as any measuring device that contains a biological element. It combines the exquisite selectivity of biology with the processing power of modern microelectronics and optoelectronics to offer powerful new analytical tools with major applications in the field of medicine, environmental studies, food and processing industries. These analytical devices are based on the union between biological and physio-chemical components. Biological components include macro-molecules such as antibodies, enzymes, tissue slices which are used to recognize and interact with a specific analyte. Physiochemical components are usually referred to as transducers which converts the interactions into signals; it is later amplified with respect to its concentration of analyte. The transducer may use potentiometric, amperometric, optical, magnetic, colorimetric devices. A target analyte in the external membrane must be able to enter the biosensor. The external membrane of the biosensor must be permeable to the analyte where the biosensor is sensitive to it. The biological element inside the biosensor then interacts with chemical species through a biochemical reaction which in turn produces another chemical product and characterized by change in mechanical, electrical properties. The output signal may be a conventional electrochemical signal depending on the type of transducer it uses.

Assessment of *P. aeruginosa* was carried out using an analytical device - immunosensor, with immobilized specific antibodies on the transducer surface. The antibodies have interact with cell antigens, and the resulting shift value resonance angle recorded. Changing the angle depends on the amount of the immune complexes formed on the transducer surface. From the obtained results on the selective surface of transducer of the immunosensor, we can see, that the diagnostic system works with IgG concentration of 1 mg/ml, working titer of 1:7 in polyclonal antibodies against *P. aeruginosa*. The resulting antiserum specific immunoglobulins can be used in preparing the selective surface of immune biosensor.

Key words: bacteria, test system, immunoglobulin, specific serum

Вступ

Мікроорганізм *Pseudomonas aeruginosa* є опортуністичним патогеном людини та тварин і активізується у випадку ослаблення імунітету носія (Qing and Luyan, 2013; Sikkema and Koopmans, 2016; Mund et al., 2017). Сучасні методи визначення мікроорганізмів, такі як ІФА або ПЛР вимагають великих проміжків часу, коштовного обладнання та реактивів (Starodub et al., 2016). Тому розробка нових недорогих, швидких та відносно дешевих методів індикації патогенних бактерій у навколишньому середовищі є актуальним питанням.

На сьогодні рівень розвитку молекулярної біології у поєднанні з досягненнями фізики і хімії визначили новий напрям в діагностиці захворювань на основі принципів біосенсорики. Серед значної кількості різних типів імунних біосенсорів особлива увага приділяється тим, що базуються на принципі поверхневого плазмонного резонансу (ППР), які належать до класу оптичних і побудовані на ефекті біоспецифічного фітінгу та дозволяють реєструвати комплекс макромолекул з високою концентраційною чутливістю (Novgorodova et al., 2016). Біосенсори складаються з трьох компонентів: біоселективного шару (зразка), детектора, що ідентифікує стимул; трансдюсера, що перетворює сигнал, який з'являється в результаті взаємодії аналіту з біоселективним елементом, та системи обробки сигналу. Біосенсор формує цифровий електричний сигнал, що пропорційний концент-

рації визначуваної сполуки чи ряду сполук (Starodub et al., 2013; Baleviciute et al., 2013).

Імунобіосенсорна тест-система на основі ППР включає розробку компонентів попередньої підготовки селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора для аналізу (Filion-Côté et al., 2017).

Метою нашої роботи було отримати антисироватки та імуноглобуліни до *P. aeruginosa* як основні компоненти для модифікації селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора.

Матеріал і методи досліджень

Кролів імунізували за схемою ґрундімунізації, що ґрунтується на введенні 1 см³ антигену (штам *P. aeruginosa* ATCC 9027) з повним ад'ювантом Фрейнда (1:1) уздовж хребта у 6 точок підшкірно з інтервалом два тижні. Через 45 діб проводили гіперімунізацію за схемою: введення підшкірно антигену спочатку з неповним ад'ювантом, а потім без ад'юванту в дозі 0,1 см³ з десятиденним інтервалом, впродовж трьох тижнів.

Кров відбирали з поверхневої вухної вени, без тотального знекровлення, з дотриманням принципів біоетики. Отриману сироватку поетапно перевіряли на активність в реакції аглютинації на склі.

З активних видоспецифічних сироваток *P. aeruginosa* виділяли загальну глобулінову фракцію білків методом висолювання насиченим розчином сульфату амонію, за методикою О.П. Бойко та ін.

(Vojko et al., 2010). Наявність білка у фракціях, що витікають з колонки, визначали з допомогою 5 %-го розчину трихлороцтової кислоти. Наявність солей амонію у фракціях, що витікають, визначали якісною реакцією з реактивом Несслера-Вінклера.

Концентрацію отриманих імуноглобулінів визначали за допомогою спектрофотометру, при довжині хвилі 280 нм.

Вимірювальний пристрій імуносенсор «Плазмон – б» на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

Трансдюсер імуносенсора у вигляді попередньо хромованої (3–5 нм шару Cr) скляної пластинки з напилим шаром золота товщиною 45 нм поєднується з призмою оптичного приладу за допомогою імерсійної рідини з коефіцієнтом заломлення 1,6.

Результати та їх обговорення

Титри антитіл у кролів, імунізованих за вищезначеною схемою, визначали на 55, 65 та 75-у добу.

До введення антигену у тварин-донорів не було виявлено специфічних антитіл до *P. aeruginosa*, але уже після двократного введення полівалентного антигену виявлено стрімке утворення антитіл (табл.1).

Специфічні антитіла у кроликів на введення антигену формувалися активно і вже на 45-ту добу імунізації досягали середніх титрів 1:16 – 1:32. На 65-ту добу, титри антитіл досягали рівня 1:32 – 1:64. На 75-ту добу титри сягали рівня 1:128 – 1:256 (рис. 1).

На основі показників титру антитіл отримані антисироватки можуть використовуватись в подальшому для виготовлення специфічних імуноглобулінів для створення іммобілізаційної матриці селективного шару трансдюсера.

Для перевірки імуноглобуліну на активність та специфічність, ми іммобілізували бактеріальну культуру *P. aeruginosa* на сенсорну поверхню чипа і проводили визначення, додаючи по краплі отриманий нами імуноглобулін (рис. 2).

Таблиця 1

Динаміка титрів антитіл у кролів під час гіперімунізації їх антигеном *P. aeruginosa* в реакції аглютинації

Кролі № п/п	Титри антитіл після імунізації			
	45-та доба	55-та доба	65-та доба	75-та доба
1	1:32	1:64	1:128	1:256
2	1:16	1:64	1:128	1:256
3	1:16	1:32	1:64	1:128

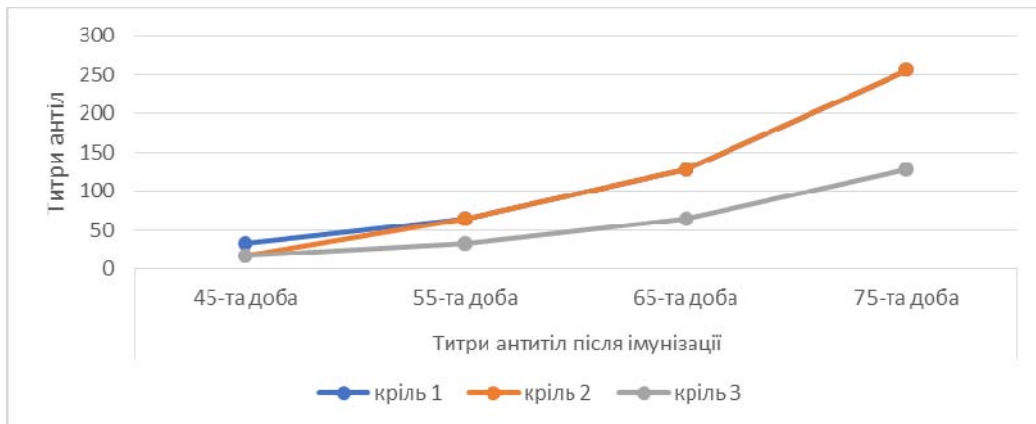


Рис. 1. Динаміка титрів антитіл у кролів під час гіперімунізації їх антигеном *P. aeruginosa*

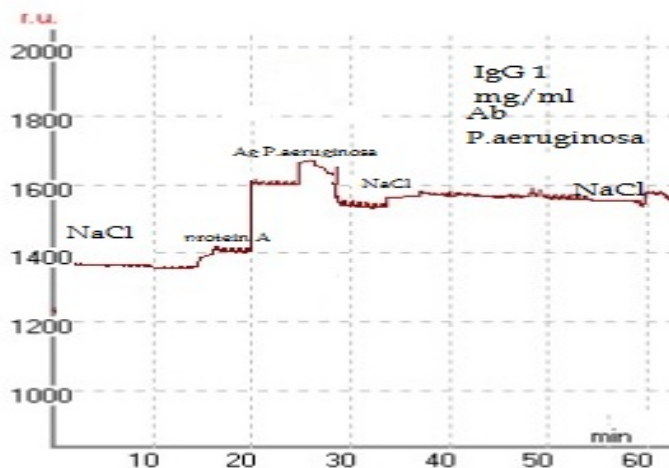


Рис. 2. Калібрування приладу «Плазмон-6» з використанням експериментального зразка IgG до *P. aeruginosa*

З відгуку імуносенсора видно, що діагностична система працює із концентрацією IgG 1мг/мл, робочий титр 1:7 в поліклональних антитілах проти *P. aeruginosa*. Наступним етапом розробки імуносенсорної тест-системи для експрес-індикації *P. aeruginosa* передбачена іммобілізація антитіл на золотій поверхні трансдюсера імунного біосенсора, а також відпрацювання алгоритму імуноаналізу за допомогою імунного біосенсора на основі ППР.

Висновки

Отримані специфічні антисироватки та імуноглобуліни можуть бути використані, як компоненти підготовки селективної поверхні трансдюсеру імунного біосенсора. Селективна поверхня трансдюсера імуносенсора на основі ППР працює із концентрацією імуноглобуліна IgG 1мг/мл, робочий титр 1:7 в поліклональних антитілах проти *P. aeruginosa*. Що дозволяє створити конкурентоспроможну діагностичну тест-систему для експрес-індикації *P. aeruginosa*.

Перспективи подальших розробок. Підготовлені компоненти для чутливої поверхні трансдюсера будуть використані у серії досліджень щодо відпрацювання алгоритму постановки імуноаналізу за допомогою імунного біосенсора на основі ППР.

Бібліографічні посилання

- Qing, Wei, Luyan, Z.Ma. (2013). Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 14(10), 20983–21005. doi: 10.3390/ijms141020983
- Sikkema, R., Koopmans, M. (2016). One Health training and research activities in Western Europe. *Infect Ecol Epidemiol.* 6: 10.3402 / iee. v6.33703. doi: 10.3402 / iee.v6.33703
- Mund, A., Diggle, S.P., Harrison, F. (2017). The fitness of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal cheats is influenced by the diffusivity of the environment. *mBio* 8:e00353-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00353-17>.
- Starodub, N., Ogorodniichuk, J., Novgorodova, O. (2016). Efficiency of Instrumental Analytical Approaches at the Control of Bacterial Infections in Water, Foods and Feed, in *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*. Edited by Dimitrios P. Nikolelis
- Novgorodova, O.Yu., Ogorodnijchuk, Yu.O., Starodub, M.F. (2016). *Naukovo-metody`chni rekomendaciyi «Biosensorny`j kontrol` bakterial`nogo zabrudnennya seredovy`shha»*. Ky`yiv (in Ukrainian).
- Starodub, N.F., Ogorodniichuk, I., Lebedeva, T., Shpylovyy, P. (2013). Optical immune biosensor «Plasmon Test» for the determination of *Salmonella typhimurium*. *Sensor Electronics and Microsystems Technology.* 10(1), 106–113.
- Baleviciute, I., Balevicius, Z., Makaraviciute, A., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. (2013). Study of antibody/antigen binding kinetics by total internal reflection ellipsometry. *Biosens Bioelectron.* 39(1), 170–176.
- Filion-Côté, S., Melaine, F., Kirka, A.G., Tabrizian, M. (2017). Monitoring of bacterial film formation and its breakdown with an angular-based surface plasmon resonance biosensor. *Analyst.* 30. doi: 10.1039/c7an00068e
- Bojko, O.P., Kucheryavenko, R.O., Bojko, P.K., Busol, V.O., Mandy`gra, M.S. (2010). *Vy`gotovlennya diagnosty`kumu dlya imunofluorescentnoyi indy`kaciyi ta identy`fikaciyi Pseudomonas aeruginosa: Metody`chni rekomendaciyi dlya specialistiv vetery`narnoyi medy`cy`ny`*, naukovciv ta studentiv. Ky`yiv: NUBiP (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 30.03.2017