

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОБСЕМЕНЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОЛН В ФОТОННЫХ КРИСТАЛЛАХ

И. О. Петрова¹, В. Н. Конопский², А. В. Суханова¹, И. Р. Набиев¹ ✉

¹ Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва

² Лаборатория спектроскопии конденсированных сред, Институт спектроскопии РАН, Троицк

Традиционные методы оценки качества продуктов питания, воды и других сред имеют ряд недостатков. Предлагается безметочный высокоточный аналитический метод многопараметрической детекции биомаркеров, основанный на анализе изменений параметров распространения поверхностных волн на поверхности фотонного кристалла (ПВФК). Метод позволяет проводить измерения молекулярных и клеточных аффинных взаимодействий в реальном времени путем независимой регистрации величин угла полного внутреннего отражения и угла возбуждения поверхностной волны на поверхности фотонного кристалла. На основании метода анализа ПВФК разработан протокол детекции экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* и термолabile токсина LT *Escherichia coli*. Протокол основан на детекции в реальном времени аффинного взаимодействия между антигенами, раствор которых прокачивается через микрофлюидную подложку каналов поверхности ФК. Показано, что метод ПВФК отличается более высокой чувствительностью, а также уменьшенным временем проведения анализа и сниженной материалозатратностью, по сравнению с методом поверхностного плазмонного резонанса.

Ключевые слова: фотонные кристаллы, поверхностные волны, бактериальные токсины, детекция в реальном времени

Финансирование: исследование поддержано Министерством здравоохранения Российской Федерации, в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)», государственный контракт № К-27-НИР/144-5 от 24.12.2015 г.

Благодарности: авторы благодарны заведующему лабораторией трансляционной биомедицины ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России А. П. Ткачуку за предоставление кроличьих антител против термолabile токсина LT.

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Руфаилович Набиев
Каширское шоссе, д. 31, г. Москва, 115529; igor.nabiev@gmail.com

Статья получена: 28.07.2018 **Статья принята к печати:** 20.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.047

MULTIPARAMETRIC DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION BASED ON THE PHOTONIC CRYSTAL SURFACE MODE DETECTION

Petrova IO¹, Konopsky VN², Sukhanova AV¹, Nabiev IR¹ ✉

¹ Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow

² Laboratory of Spectroscopy of Condensed Matter, Institute for Spectroscopy, Russian Academy of Sciences, Troitsk

Conventional techniques for food and water quality control and environmental monitoring in general have a number of drawbacks. Below we propose a label-free highly accurate analytical technique for multiplex detection of biomarkers based on the analysis of propagation of Bloch waves on the surface of a photonic crystal. The technique can be used to measure molecular and cell affinity interactions in real time by recording critical and excitation angles of the surface wave on the surface of a photonic crystal. Based on the analysis of photonic crystal surface modes, we elaborated a protocol for the detection of the exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* and the heat-labile toxin LT of *Escherichia coli*. The protocol exploits detection of affinity interactions between antigens pumped through a microfluidic cell and detector antibodies conjugated to the chemically activated silica chip. The proposed technique is highly sensitive, cheap and less time-consuming in comparison with surface plasmon resonance.

Keywords: photonic crystals, surface modes, bacterial toxins, real-time detection

Funding: this work was part of the Federal Targeted Program *The National system of Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015-2020)* supported by the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (State grant No. K-27-НИР/144-5 dated December 24, 2015).

Acknowledgement: the authors wish to thank Tkachuk AP, Head of the Department of Translational Biomedicine (Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology) for rabbit antibodies against the heat-labile toxin LT.

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor R. Nabiev
Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115529; igor.nabiev@gmail.com

Received: 28.07.2018 **Accepted:** 20.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.047

Детекция бактериального обсеменения и токсинов, вырабатываемых патогенной флорой, в жидкой пробе чрезвычайно важна для оценки качества пищевых продуктов, воды и других сред. Общеизвестным методом детекции патогенов является полимеразная цепная реакция

(ПЦР), которая, обладая высокой чувствительностью, представляет собой довольно длительную, трудоемкую и материалоемкую процедуру. Кроме того, зачастую важно определение в пробе не самих бактериальных клеток, а их метаболитов, в частности токсинов белковой

природы, являющихся основным фактором патогенности. Поскольку с помощью ПЦР проводят детекцию нуклеиновых кислот, данный метод неприменим как для детекции бактериальных токсинов, так и для обнаружения некоторых специфических патогенов, например прионов.

В настоящее время используют классические методы детекции белков (в частности, токсинов) в жидкой пробе. Традиционные подходы, такие как вестерн-блот и иммунофлюоресцентный анализ (ИФА), сравнительно просты и имеют невысокую стоимость, но обладают низкой производительностью и требуют длительного времени. Они подходят для клинико-диагностических работ, но после дополнительной подготовки образца и использования ферментативных или флуоресцентных меток для амплификации специфического сигнала, что увеличивает материальные затраты и трудоемкость анализа.

Кроме того, разрабатываются более современные методы детекции, включающие электрохимический иммуноанализ [1–2], хемилюминесцентную визуализацию [3], флуоресцентную детекцию в потоке с помощью активированных микросфер из диоксида кремния [4] и электрохимический анализ на основе полимерных псевдоантител [5]. Важным преимуществом этих методов является многопараметричность анализа, т. е. возможность одновременной детекции различных аналитов в одном образце. В отличие от традиционных методов, данные подходы высокопроизводительны, но дорогостоящи и сложны в интерпретации, что делает их неподходящими для рутинной практики. Большая часть этих методов требует использования дополнительных меток, за исключением безметочного электрохимического анализа — чувствительного и элегантного подхода, который, однако, неприменим для многопараметрического исследования [6].

Чрезвычайно перспективен метод детекции с помощью поверхностного плазмонного резонанса [7], основанный на возбуждении падающим светом поверхностных плазмон-поляритонов на границе раздела «металл-диэлектрик». Этот чувствительный быстрый и безметочный метод не требует сложной предварительной подготовки образца. Антитела, специфичные к целевому белку, конъюгируются с поверхностью тонкой золотой пленки, и массоперенос, связанный со взаимодействием этих антител с растворимым антигеном, присутствующим в жидкой пробе, регистрируется как изменение показателя преломления поверхностного слоя жидкости вблизи поверхности золотой пленки.

I. Дизайн эксперимента

В настоящей работе предложен новый подход к выявлению бактериального обсеменения, основанный на детекции поверхностных волн на фотонном кристалле (ПВФК). ФК представляет собой материал, характеризующийся периодической модуляцией показателей преломления (ПП) в масштабе длины световой волны. Такие структуры поддерживают дальнедействующее распространение поверхностных оптических волн вдоль своей внешней поверхности. ПВФК используют в многочисленных оптических сенсорах [8–10]. Есть данные о том, что сенсоры, основанные на ПВФК, превосходят по чувствительности сенсоры на основе принципа поверхностного плазмонного резонанса [9]. С использованием ПВФК возможна детекция обоих видов поляризации (параллельной и перпендикулярной) световой волны, позволяющая регистрировать отдельно толщину поверхностного слоя и показатель преломления

жидкой фазы, так что результат изменения параметров отраженного сигнала несет в себе информацию о факте взаимодействия (массопереноса) растворимого аналита с функционализированной поверхностью ФК вне зависимости от изменений показателя преломления вблизи этой поверхности.

Кроме того, важным преимуществом метода детекции с использованием ПВФК является возможность простой регенерации поверхности используемых подложек плазменной очисткой и последующей активации и конъюгации с новым распознающим белком. Эта возможность позволяет использовать одну и ту же подложку ФК бесконечное количество раз, а также готовить заранее активированные подложки ФК для конкретного эксперимента.

В настоящей работе проведено исследование взаимодействия полимерных микросфер, покрытых слоем полиэлектролита (отрицательно заряженной поли(акриловой) кислоты), с поверхностью ПВФК-биосенсора, покрытой положительно заряженным поли(4-стиренсульфонатом) натрия. Поскольку микросферы диаметром 4,08 мкм можно рассматривать как модель бактериальной клетки, проведенные эксперименты демонстрируют принципиальную возможность детекции бактериальных клеток в жидкой пробе с помощью ПВФК-биосенсора.

Кроме этого, показана возможность детекции с помощью ПВФК-биосенсора бактериальных токсинов в жидкой пробе. В качестве объектов для количественного анализа были выбраны экзотоксин А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и термолабильный токсин LT бактерии *Escherichia coli*.

Рассмотрим подробнее основные этапы разработки аналитического метода многопараметрической детекции биомаркеров и его использование для определения бактериальных токсинов.

II. Подготовительные этапы

1. Реагенты

В работе использовали следующие реагенты: хлорид натрия, > 99% (Sigma-Aldrich, S6191; США); этанол, 99,5% (Acros Organics, AC615090010; Бельгия); уксусная кислота, 99,8% (Acros Organics, 268310010; Бельгия); (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС), 99% (Sigma-Aldrich, 440140; США); глутаровый альдегид, grade I, 25% в H₂O (Sigma-Aldrich, G5882; США); натрия фосфат двухосновный гептагидрат, 98–102% (Sigma-Aldrich, S9390; США); натрия фосфат одноосновный моногидрат, ≥ 98% (Sigma-Aldrich, S9638; США); фосфатно-солевой буфер (PBS) в таблетках (Sigma-Aldrich, P4417; США); белок А, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard (Sigma-Aldrich, 1578805; США); поли(4-стиренсульфонат) натрия (PSS), средняя мол. масса 70 000 (Sigma-Aldrich, 243051; США); поли(аллиламин)гидрохлорид (ПАН), средняя мол. масса 50 000 (Sigma-Aldrich, 283223; США); поли(акриловая) кислота (PAA), средняя мол. масса 130000 (Sigma-Aldrich, 181293; США); антитело против экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, кроличье, цельная антисыворотка (Sigma-Aldrich, P2318; США); экзотоксин А бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, лиофилизированный порошок (Sigma-Aldrich, P0184; США); термолабильный токсин LT бактерии *Escherichia coli*, субъединица В, рекомбинантный, > 90%, лиофилизированный порошок (Sigma-Aldrich, E8656; США); бычий сывороточный альбумин (BSA), лиофилизированный

порошок, кристаллический, $\geq 98,0\%$ (GE) (Sigma-Aldrich, 05470; США).

Кроличьи антитела против термолabileного токсина LT были любезно предоставлены заведующим лабораторией трансляционной биомедицины ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, А. П. Ткачуком.

2. Биосенсор на основе детекции поверхностных волн в фотонном кристалле

В работе использовали ПВФК-биосенсор EVA 2.0 [10]. В биосенсоре использовали следующую структуру одномерного ФК: субстрат/(LH)₃L'/вода, где L — слой SiO₂ толщиной $d_1 = 186,4$ нм, H — слой Ta₂O₅ с толщиной $d_2 = 115,2$ нм и L' — слой SiO₂ с толщиной $d_3 = 776,8$ нм.

Семислойную структуру (начинающуюся и заканчивающуюся слоями SiO₂) создавали методом магнетронного напыления. Призма и стеклянная пластина были изготовлены из стекла BK-7. Показатели преломления субстрата, SiO₂, Ta₂O₅ и воды при $\lambda = 632,8$ нм составляли $n_0 = 1,515$; $n_1 = n_3 = 1,47$; $n_2 = 2,07$ и $n_5 = 1,332$ соответственно.

Данные, полученные с использованием биосенсора, обрабатывали в программе Origin 8.1 (OriginLab; США).

3. Микросферы

Латексные микросферы диаметром 4,08 мкм (MF-COOH-AR421 Carboxyl-modified Melamine Resin-Research Particles, 10 мл 10% w/v aq. suspension (microParticles GmbH; Германия)) покрывали чередующимися слоями противоположно-заряженных полиэлектролитов PAAH и PSS путем послойного осаждения [11] по схеме PAAH/PSS/PAAH/PSS/PAAH, после чего нанесли завершающий слой PAA.

4. Подготовка кремниевой подложки фотонного кристалла для эксперимента с микросферами

Кремниевую подложку ФК перед экспериментом выдерживали в ультрафиолетовом очистителе не менее 30 мин.

К подготовленной подложке присоединяли измерительную микрофлюидную ячейку. Для прокачивания жидкости через измерительную ячейку использовали перистальтический насос. После сборки измерительной ячейки для активирования поверхности подложки ФК аминогруппами через нее пропускали водный раствор АПТЭС (1%) в течение 5 мин, при скорости потока 100 мкл/мин. После этого через измерительную ячейку пропускали поочередно, в течение 5 мин каждый, растворы PSS и PAAH в 0,5 М NaCl с концентрациями 100 мг/мл. При смене растворов ячейку промывали 0,5 М NaCl. Для равномерного покрытия поверхности подложки последовательно наносили три бислоя PSS/PAAH. После нанесения последнего слоя PAAH, среду поменяли на натрий-фосфатный буфер концентрацией 100 мМ (рН 8,0), содержащий 0,5 М NaCl. Описанные выше микросферы суспендировали в том же буфере в концентрации 10⁶ микросфер на 1 мл. Суспензию микросфер пропускали через измерительную ячейку при скорости 100 мкл/мин в течение 10 мин.

5. Подготовка кремниевой подложки фотонного кристалла для экспериментов с белками

Фотонно-кристаллическую подложку выдерживали в ультрафиолетовом очистителе по 30 мин для очистки каждой стороны ФК и затем обрабатывали по 5 мин

ультразвуком последовательно в ацетоне, этаноле и трижды в воде milliQ, после чего сушили при 70 °С. Очищенную подложку инкубировали в 1% растворе АПТЭС в ацетоне в течение 16 ч, чтобы функционализировать поверхность подложки аминогруппами, после чего прокачивали при 120 °С в течение 90 мин. Полученные аминированные подложки могут храниться не менее месяца без потери своих свойств. Перед измерением подложку обрабатывали 2,5% раствором глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 30 мин при слабом перемешивании. При подготовке подложек не использовали декстран или какой-либо другой каркасный полимер.

К подготовленной подложке присоединяли проточную ячейку. Скорость потока составляла 30 мкл/мин. Чтобы функционализировать поверхность подложки специфическими распознающими антителами, сначала через проточную ячейку пропускали раствор белка А (50 мкг/мл) в PBS до стабилизации сигнала, а затем промывали ячейку раствором PBS в течение 2 мин. После образования химически связанного с поверхностью монослоя белка А, через проточную ячейку пропускали раствор антител (50 мкг/мл) до достижения стабилизации сигнала. Наличие на поверхности подложки белка А, связывающего Fc-фрагмент иммуноглобулина, обеспечивало единообразную ориентацию связанных с ним молекул антител. Затем непрореагировавшие участки поверхности подложки блокировали 2% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS-буфере. После этого проточную ячейку промывали раствором PBS до выхода сигнала на плато. На последнем этапе, исследуемый образец пропускали через ячейку со скоростью 30 мкл/мин.

III. Осаждение микросфер, покрытых слоем полиэлектролита, на подложку, покрытую слоем противоположно заряженного полиэлектролита

Последовательное осаждение слоев полиэлектролитов на активированную АПТЭС поверхность подложки вызывает ступенчатое увеличение толщины поверхностного слоя (рис. 1А). Наблюдаемые значения толщины первых слоев PSS и PAAH меньше последующих, что свидетельствует о неполном покрытии поверхности первыми слоями полиэлектролитов.

Связывание на поверхности ФК микросфер, покрытых PAA, вызывает медленное увеличение наблюдаемой толщины поверхностного слоя, отсутствующее при пропускании буферного раствора, не содержащего микросфер.

Отметим, что кинетика связывания микросфер имеет линейный характер ($R^2 = 0,996$), а не зависимость типа «доза-ответ» (рис. 1Б). Это можно объяснить низкой концентрацией микросфер, далекой от насыщения поверхности подложки (площадь поверхности подложки, взаимодействующая с раствором, в соответствии с конструкцией измерительной ячейки, равна 1 см²). Площадь, занимаемая одной микросферой на поверхности подложки, не превышает 13 мкм², т. е. для полного покрытия поверхности необходимо $\sim 10^7$ микросфер. Можно предположить, что толщина монослоя микросфер должна быть равна диаметру микросферы, т. е. 4,08 мкм. Соответственно, связывание 10⁶ микросфер должно соответствовать наблюдаемой толщине поверхностного слоя в 400 нм. Однако при малых значениях толщины можно измерить только оптическую толщину слоя, т. е. физическую толщину, умноженную на показатель

преломления. Приняв показатель преломления равным 1,56 [10], получим ожидаемую толщину в 624 нм, которая соответствует наблюдаемой. Зная скорость потока, скорость увеличения толщины поверхностного слоя и концентрацию микросфер, можно приблизительно оценить количество связанных микросфер. За 10 мин пропускания 106 микросфер поверхностный слой увеличивается на 0,57 нм, что соответствует связыванию приблизительно 1×10^3 микросфер. Таким образом, наблюдается связывание около 0,001 части от общего количества прокачиваемых микросфер.

IV. Детекция бактериальных токсинов

Для демонстрации детекции белковых токсинов в растворе с помощью ПВФК-биосенсора выбрали два токсина — экзотоксин бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и термолабильный токсин бактерии *Escherichia coli*.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) — грамотрицательная подвижная палочковидная бактерия размерами 1–5 мкм на 0,5–1 мкм, обитает в воде и почве, условно патогенна для человека и является возбудителем нозокомиальных инфекций. Экзотоксин А бактерии состоит из трех доменов: связывающего, транспортного и катализирующего. Его цитотоксическое действие обусловлено катализирующим доменом, который ингибирует синтез белков путем АДФ-рибозилирования фактора элонгации EF-2 [12–13]. Детекция экзотоксина А является важной диагностической задачей, для решения которой применяют ПЦР (определение соответствующего гена) [14], ИФА (детекция присутствия экзотоксина) и другие аналитические методы.

Escherichia coli (кишечная палочка) — грамотрицательная палочковидная бактерия, обитающая в нижних отделах кишечника теплокровных животных. Энтеротоксигенные штаммы *Escherichia coli* способны вызывать диарею за счет продукции токсинов, в частности термолабильного токсина

LT. Токсин состоит из двух субъединиц: каталитически активной субъединицы А и субъединицы В, отвечающей за связывание с клеткой [15]. Экспрессия LT не только стимулирует секрецию, но и способствует связыванию бактерий с клетками эпителия [16].

Для детекции токсинов была разработана специальная система измерительных ячеек с одним, двумя или четырьмя каналами. Стеклокамера с одной, двумя или четырьмя полостями присоединяется к чувствительной поверхности подложки из оксида кремния, которую после химической активации функционализируют распознающими молекулами. Амплитуда сигнала, регистрируемого при взаимодействии антиген–антитело на поверхности сенсора, прямо пропорциональна количеству связывающихся сайтов на поверхности. Непрореагировавшую поверхность сенсора покрывают БСА, чтобы избежать неспецифического сигнала.

У ячеек с двумя или четырьмя каналами можно использовать один из каналов в качестве отрицательного контроля; его поверхность вместо антител покрывают БСА.

Раствор экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* с концентрацией 50 мкг/мл в буфере PBS пропускали через измерительную ячейку со скоростью 100 мкл/мин (рис. 2). Полученная кривая аналогична сенсограмме поверхностного плазмонного резонанса и следует той же кинетике [17]. Связывание белка с поверхностью сенсора вызывает стремительный рост толщины поверхностного слоя, который через некоторое время достигает плато. Плато соответствует стационарному состоянию, когда скорости адсорбции и десорбции равны. Кинетическая кривая может быть аппроксимирована моделью адсорбции Лэнгмюра. Теоретически предсказано, что массовый предел детекции с помощью ПВФК составляет 70 фг/мм² зондируемого участка поверхности сенсора, что существенно превышает чувствительность метода поверхностного плазмонного резонанса [18]. На практике, однако, несмотря на небольшой уровень шума, минимальная концентрация экзотоксина А, которая могла

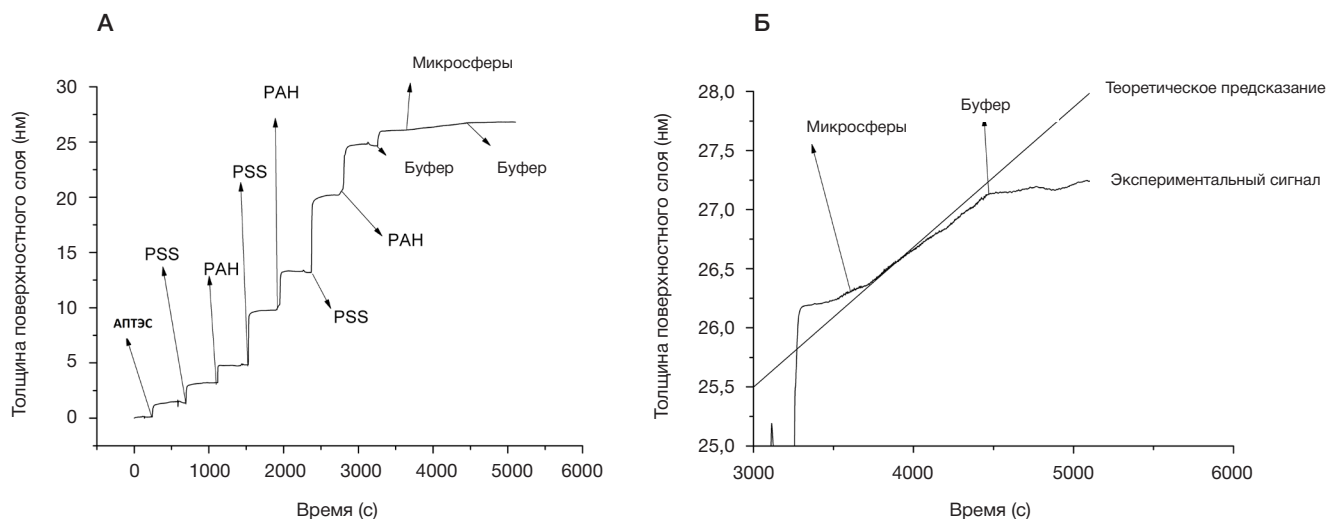


Рис. 1. Изменение толщины поверхностного слоя биосенсора на основе фотонного кристалла на последовательных этапах предварительной обработки его поверхности и проведении модельного эксперимента по взаимодействию микросфер, покрытых слоем полиэлектролита, с подложкой фотонного кристалла, покрытой противоположно заряженным полиэлектролитом. **А.** Показана динамика изменения толщины поверхностного слоя фотонного кристалла при последовательной обработке поверхности фотонного кристалла аминированием (обработка АПТЭС) и при осаждении слоев противоположно заряженных полиэлектролитов: поли(4-стиренсульфонат) натрия (PSS) и поли(аллиламин)гидрохлорид (ПАН). Обращает на себя внимание увеличение наблюдаемой толщины для каждого из последующих поверхностных слоев полиэлектролита. Эффект пропускания через микрофлюидную ячейку натрий-фосфатного буфера (рН 8.0), содержащего 0,5 М NaCl, отмечен стрелкой с надписью «буфер». Микросферы, моделирующие бактерии, были суспендированы в том же буфере; эффект пропускания суспензии микросфер отмечен стрелкой с надписью «микросферы». **Б.** Представлена динамика увеличения наблюдаемой толщины поверхностного слоя фотонного кристалла в процессе пропускания через ячейку суспензии микросфер, покрытых поли(акриловой) кислотой (РАА). В точке, обозначенной стрелкой с надписью «буфер», пропускание через ячейку суспензии микросфер прекращено и начата прокачка буфера. Показаны также результаты теоретического моделирования связывания модельных микросфер с поверхностью фотонного кристалла (см. текст)

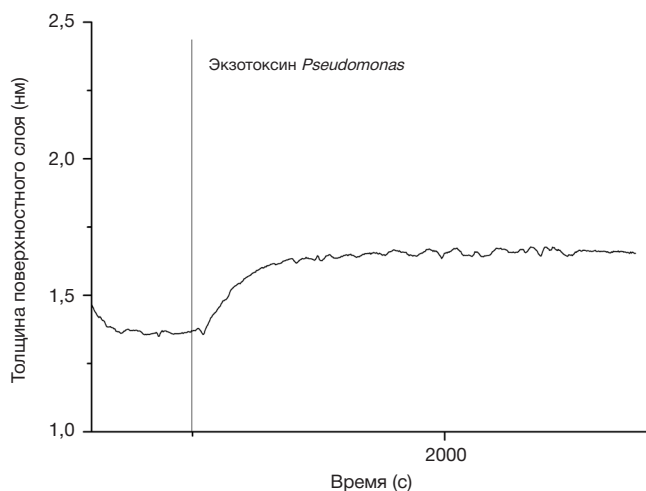


Рис. 2. Пример детекции экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* с помощью биосенсора, основанного на принципе детекции изменения распространения поверхностных волн в фотонном кристалле

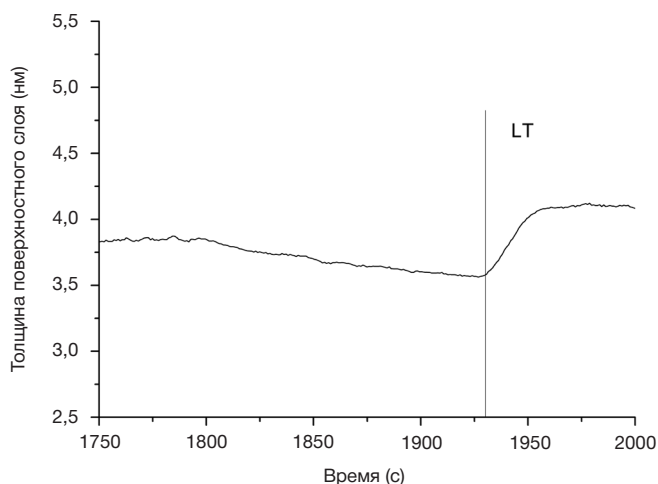


Рис. 3. Пример детекции термолабильного токсина LT бактерии *Escherichia coli* с помощью биосенсора, основанного на принципе детекции изменения распространения поверхностных волн в фотонном кристалле

быть определена в эксперименте, составила 30 мкг/мл. На сенсограмме детекции термолабильного токсина LT (50 мкг/мл в PBS) массовый предел детекции составил 10 мкг/мл (рис. 3).

Следует отметить, что в эксперименте работали с цельной антисывороткой. Использование аффинно-очищенных антител, безусловно, позволит достичь предела чувствительности, близкого к рассчитанному [18] и существенно превышающего чувствительность метода поверхностного плазмонного резонанса.

V. Кинетика связывания бактериальных клеток с поверхностью сенсора, функционализированной антителами

Верхний предел скорости связывания микросфер по формуле Смолуховского–Левича [19] составляет 3,46 частиц/см²; так как рабочая площадь поверхности сенсора в данном случае составляет 1 см², этот результат соответствует связыванию около 2000 частиц за 10 мин. Можно сделать вывод, что скорость связывания микросфер, покрытых полиэлектролитом, с поверхностью биосенсора, покрытого слоем противоположно заряженного полиэлектролита, в данной системе близка к предельно возможной. Вероятно, значение скорости не достигает максимума, так как связывание микросферы с поверхностью не происходит мгновенно, и в реальных условиях кинетика определяется не только диффузией микрочастиц, но и их взаимодействием с поверхностью. Поэтому можно предположить, что кинетика связывания бактериальных клеток с поверхностью сенсора, функционализированной антителами, может отличаться от продемонстрированной на микросферах.

Следует отметить, что изменение состава раствора, содержащего микросферы, не вызывает принципиальных изменений в кинетике связывания.

VI. Оптимизация детекции бактериальных токсинов

Полученные результаты показывают принципиальную возможность проведения многопараметрической детекции бактериальных токсинов с помощью ПВФК-биосенсора. Предел детекции токсинов можно снижать: (1) использованием аффинно-очищенных антител к токсинам; сродство антител к антигенам крайне важно, так как каждая неаффинная молекула уменьшает полезную площадь чувствительной поверхности сенсора; (2) изменением параметров измерительной ячейки [20]; (3) усилением сигнала с помощью золотых наночастиц; поскольку интенсивность сигнала от ПВФК зависит от массопереноса, использование в качестве дополнительной метки специфических антител, распознающих стерически удаленный эпитоп целевого белка и конъюгированных с коллоидным золотом, позволит значительно усилить ответ при той же концентрации детектируемого аналита [21–22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показана принципиальная возможность детекции в жидкой пробе микрочастиц, соответствующих по размерам бактериальной клетке, с помощью детекции ПВФК. Полученные результаты могут быть полезны для разработки протоколов детекции бактериальных клеток в реальном времени в проточном режиме. Продемонстрирована возможность многопараметрической детекции бактериальных токсинов белковой природы — экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и термолабильного токсина LT бактерии *Escherichia coli*. Полученные результаты позволят разработать быстрые и доступные по стоимости методы детекции бактериального обсеменения пищевых продуктов и воды, а также диагностики бактериальных инфекций путем обнаружения бактерий и их метаболитов в образцах биологических жидкостей.

Литература

1. Wilson MS. Electrochemical Immunosensors for the Simultaneous Detection of Two Tumor Markers. *Anal Chem.* 2005; 77 (5): 1496–1502.
2. Xu T, Jia X, Chen X, Ma Z. Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using metal ions tagged immunocolloidal gold. *Biosens Bioelectron.* 2014; (56): 174–9.

3. Zong C, Wu J, Wang C, Ju H, Yan F. Chemiluminescence Imaging Immunoassay of Multiple Tumor Markers for Cancer Screening. *Anal Chem.* 2012; 84 (5): 2410–15.
4. Zhao Y, Zhao X, Pei X, et al. Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array. *Anal Chim Acta.* 2009; 633 (1): 103–8.
5. Ravalli A, Gomes C, Yamanaka H, Marrazza G. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection : The case of HER2. *Bioelectrochemistry.* 2015; 106 (Pt B): 268–75.
6. Gomes RS, Moreira FTC, Fernandes R, Sales MGF. Sensing CA 15–3 in point-of-care by electropolymerizing O-phenylenediamine (oPDA) on Au-screen printed electrodes. *PLoS One.* 2018; 13(5): [about 1 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196656>
7. Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Switzerland).* 2015; 15 (5): 10481–510.
8. Michelotti F, Sciacca B, Dominici L, Quaglio M. Fast optical vapour sensing by Bloch surface waves on porous silicon membranes. *Phys Chem Chem Phys.* 2010; (12): 502–6.
9. Khan MU, Corbett B. Bloch surface wave structures for high sensitivity detection and compact waveguiding. *Sci Technol Adv Mater.* 2016; 17 (1): 398–409
10. Konopsky V, Karakouz T, Alieva E, Vicario C, Sekatskii S, Dietler G. Photonic Crystal Biosensor Based on Optical Surface Waves. *Sensors.* 2013; 13 (3): 2566–78.
11. Bilan RS, Krivenkov VA, Berestovoy MA, et al. Engineering of Optically Encoded Microbeads with FRET-Free Spatially Separated Quantum-Dot Layers for Multiplexed Assays. *Chem Phys Chem.* 2017; 18 (8): 970–9.
12. Toren P, Ozgur E, Bayindir M. Label-Free Optical Biodetection of Pathogen Virulence Factors in Complex Media Using Microtoroids with Multifunctional Surface Functionality. *ACS Sensors.* 2018; 3 (2): 352–9.
13. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D. Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A: Adenosine Diphosphate-Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 In Vitro and In Vivo. 1977; 15 (1): 138–44.
14. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 (10): 3739–45.
15. Norton EB, Branco LM, Clements JD. Evaluating the A-Subunit of the Heat-Labile Toxin (LT) As an Immunogen and a Protective Antigen Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *PLoS One.* 2015; 10 (8): [about 1 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549283/>
16. Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of Heat-Labile Enterotoxin in Colonization of the Adult Mouse Small Intestine by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun.* 2006; 74 (2): 869–75.
17. Schasfoort RBM, Tudos AJ, editors. *Handbook of Surface Plasmon Resonance.* Лондон: RSC Publisher; 2013. 524 c.
18. pcbiosensors.com [Internet]. Troitsk: PCbiosensors company. 2013 — [cited July 18, 2018.]. Available at: <http://pcbiosensors.com/technology/technology.htm>.
19. Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE : Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. *Biophysical Journal.* 1998; 75 (August): 583–94.
20. Lynn NS, Homola J. Biosensor Enhancement Using Grooved Micromixers: Part I, Numerical Studies. *Anal Chem.* 2015; 87 (11): 5524–30.
21. Springer T, Homola J. Biofunctionalized gold nanoparticles for SPR-biosensor-based detection of CEA in blood plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404 (10): 2869–75.
22. Lee J, Cho H, Choi HK, Lee J-Y, Choi J-W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (7): [about 14 p.]. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/2021>

References

1. Wilson MS. Electrochemical Immunosensors for the Simultaneous Detection of Two Tumor Markers. *Anal Chem.* 2005; 77 (5): 1496–1502.
2. Xu T, Jia X, Chen X, Ma Z. Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using metal ions tagged immunocolloidal gold. *Biosens Bioelectron.* 2014; (56): 174–9.
3. Zong C, Wu J, Wang C, Ju H, Yan F. Chemiluminescence Imaging Immunoassay of Multiple Tumor Markers for Cancer Screening. *Anal Chem.* 2012; 84 (5): 2410–15.
4. Zhao Y, Zhao X, Pei X, et al. Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array. *Anal Chim Acta.* 2009; 633 (1): 103–8.
5. Ravalli A, Gomes C, Yamanaka H, Marrazza G. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection : The case of HER2. *Bioelectrochemistry.* 2015; 106 (Pt B): 268–75.
6. Gomes RS, Moreira FTC, Fernandes R, Sales MGF. Sensing CA 15-3 in point-of-care by electropolymerizing O-phenylenediamine (oPDA) on Au-screen printed electrodes. *PLoS One.* 2018; 13(5): [about 1 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196656>
7. Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Switzerland).* 2015; 15 (5): 10481–510.
8. Michelotti F, Sciacca B, Dominici L, Quaglio M. Fast optical vapour sensing by Bloch surface waves on porous silicon membranes. *Phys Chem Chem Phys.* 2010; (12): 502–6.
9. Khan MU, Corbett B. Bloch surface wave structures for high sensitivity detection and compact waveguiding. *Sci Technol Adv Mater.* 2016; 17 (1): 398–409
10. Konopsky V, Karakouz T, Alieva E, Vicario C, Sekatskii S, Dietler G. Photonic Crystal Biosensor Based on Optical Surface Waves. *Sensors.* 2013; 13 (3): 2566–78.
11. Bilan RS, Krivenkov VA, Berestovoy MA, et al. Engineering of Optically Encoded Microbeads with FRET-Free Spatially Separated Quantum-Dot Layers for Multiplexed Assays. *Chem Phys Chem.* 2017; 18 (8): 970–9.
12. Toren P, Ozgur E, Bayindir M. Label-Free Optical Biodetection of Pathogen Virulence Factors in Complex Media Using Microtoroids with Multifunctional Surface Functionality. *ACS Sensors.* 2018; 3 (2): 352–9.
13. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D. Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A: Adenosine Diphosphate-Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 In Vitro and In Vivo. 1977; 15 (1): 138–44.
14. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 (10): 3739–45.
15. Norton EB, Branco LM, Clements JD. Evaluating the A-Subunit of the Heat-Labile Toxin (LT) As an Immunogen and a Protective Antigen Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *PLoS One.* 2015; 10 (8): [about 1 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549283/>
16. Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of Heat-Labile Enterotoxin in Colonization of the Adult Mouse Small Intestine by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun.* 2006; 74 (2): 869–75.
17. Schasfoort RBM, Tudos AJ, editors. *Handbook of Surface Plasmon Resonance.* Лондон: RSC Publisher; 2013. 524 c.
18. pcbiosensors.com [Internet]. Troitsk: PCbiosensors company. 2013 – [cited July 18, 2018.]. Available at: <http://pcbiosensors.com/technology/technology.htm>.
19. Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE :

- Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. *Biophysical Journal*. 1998; 75 (August): 583–94.
20. Lynn NS, Homola J. Biosensor Enhancement Using Grooved Micromixers: Part I, Numerical Studies. *Anal Chem*. 2015; 87 (11): 5524–30.
21. Springer T, Homola J. Biofunctionalized gold nanoparticles for SPR-biosensor-based detection of CEA in blood plasma. *Anal Bioanal Chem*. 2012; 404 (10): 2869-75.
22. Lee J, Cho H, Choi HK, Lee J-Y, Choi J-W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (7): [about 14 p.]. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/2021>