

## **МОДИФІКАЦІЯ ТРАНСДЮСЕРНОЇ ПОВЕРХНІ БІОСЕНСОРУ НА ОСНОВІ ППР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВРХ**

**М. Ф. СТАРОДУБ**, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

**М. І. ФЕДЕЛЕС-ГЛАДИНЕЦЬ**, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

**М. В. САВЧУК**, науковий співробітник

**О. П. ТАРАН**, кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії біосенсорики кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

**Національний університет біоресурсів і природокористування  
України**

*E-mail:* nfstarodub@gmail.com

**Анотація.** Лейкоз ВРХ – широко розповсюджена хронічна хвороба пухлинної природи, що протікає безсимптомно або характеризується лімфоцитозом і ростом лімфоїдних клітин в різних органах тварин. Така хвороба приносить величезні збитки в сільськогосподарських господарствах. Основним заходом для подолання цієї хвороби є вчасна діагностика і своєчасне вибраковування хворих тварин на основі даних діагностики. Загальноприйнятими методами діагностики лейкозу ВРХ є методи РІД та ІФА. Однак ці методи являються довготривалими та потребують досліджень в лабораторії, кваліфікованого персоналу. Тому на даний час актуальним є розробка нових приладів для експрес-діагностики стану тварин в польових умовах.

Метою роботи було відпрацювати основні підходи функціоналізації трансдюсерних поверхонь для підвищення сигналу біосенсору для діагностики лейкозу ВРХ. В роботі використовували імунологічні та статистичні методи досліджень. Порівнянням сигналів біосенсора на основі ППР після його функціоналізації рекомбінантними антигенами gr51 та p24 встановлено, що створення на поверхні трансдюсера проміжного шару взагалі, а особливо за використання для цього ПАА (порівняно з додекантіолом) дозволяє не лише збільшити відгук, а й досягти його необхідної відтворюваності впродовж принаймні 4-х місяців. Похідні декстрану також збільшують відгук біосенсора, але не забезпечують його стабільності при зберіганні функціоналізованої поверхні.

**Ключові слова:** біосенсор, лейкоз великої рогатої худоби, трансдюсер, антиген, додекантіол, декстран, поліаліламін

**Актуальність.** Лейкоз – це пухлинне захворювання гемолімфопоетичної системи, що характеризується злоякісним розростанням кровотворних тканин, порушенням процесу визрівання клітин з переважно інтенсивним утворенням молодих форм [1, с. 3-8]. На лейкоз хворіють усі види ссавців, птахи, риби. Особливо широко він розповсюджений серед великої рогатої худоби (ВРХ), що

zareєстровано в багатьох країнах на всіх континентах. Є відомості про те, що до лейкозу тварин чутливі і люди. Особливістю захворювання є довготривалий перебіг хвороби без помітних порушень у стані здоров'я тварин [2, с. 18-19].

Важливою світовою проблемою є експресний контроль розповсюдження ретровірусної інфекції серед людей та тварин. Як відомо, ретровіруси є збудниками набутого імунodefіциту у людей, що відомий як захворювання на СНІД; вони, зокрема, є також збудниками вірусного лейкозу великої рогатої худоби, вірусних хвороб риб, наприклад, карциноми у щуки тощо [3, с. 62]. Що стосується захворювань, обумовлених ретровірусною інфекцією то основним заходом для його подолання є постійна діагностика. У випадку з тваринами хворі особини виключаються з гурту та знищуються. Зважаючи на це, особлива увага приділяється засобам діагностики. Загальноприйнятим способом виявлення цього захворювання є використання традиційного імунферментного аналізу, відомого, як метод ELISA-метод [4, с. 88-92]. Для аналізу використовують, як правило, проби крові, що забирають з шийної вени. Але сам метод є довготривалим (час аналізу займає близько 6 годин), коштовним (вартість одного аналізу більше 5 доларів США), досить складним, вимагає високої професійної підготовки виконавців та спеціального високовартісного обладнання і реагентів (різних "кон'югатів", хімічних компонентів). В Україні застосовується більш дешевий, але менш чутливий і ще більш рутинний метод – реакція імунодифузії (РІД). Все це не дає змоги вести постійний моніторинг за станом тварин, а ефективно оздоровлення стада вимагає проводити обстеження принаймні через кожні 10 днів за виявлення в ньому хворих тварин. Існуючими методами це неможливо здійснити як через досить значну вартість аналізу, так і через складність такого частого взяття проб крові. Усі ці проблеми успішно вирішуються у разі застосування запропонованого для розробки імунного біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Такий імунний біосенсор може забезпечити: 1) прямий аналіз, без використання додаткових реагентів; 2) експресний аналіз протягом 3-5 хвилин; 3) аналіз без взяття крові, а використовуючи краплину молока; 4) дешевий аналіз, вартістю менше 1 долара США [5, с.144-149]. Імунні біосенсори на основі ППР вже запропоновано для окремих клінічних досліджень, але ці варіанти, по-перше, не придатні для широкого застосування, зокрема для експрес-аналізів в польових умовах, коли потрібно проводити аналізи за короткий час і забезпечити їх невисоку вартість, а по-друге, вони не спрямовані на діагностику ретровірусного лейкозу тварин. На базі таких сенсорів можливо створити нові системи експрес-діагностики вірусних захворювань, які будуть конкурентоспроможні на світовому ринку [5, с. 144-149; 6, с.1-4; 7, 307-316].

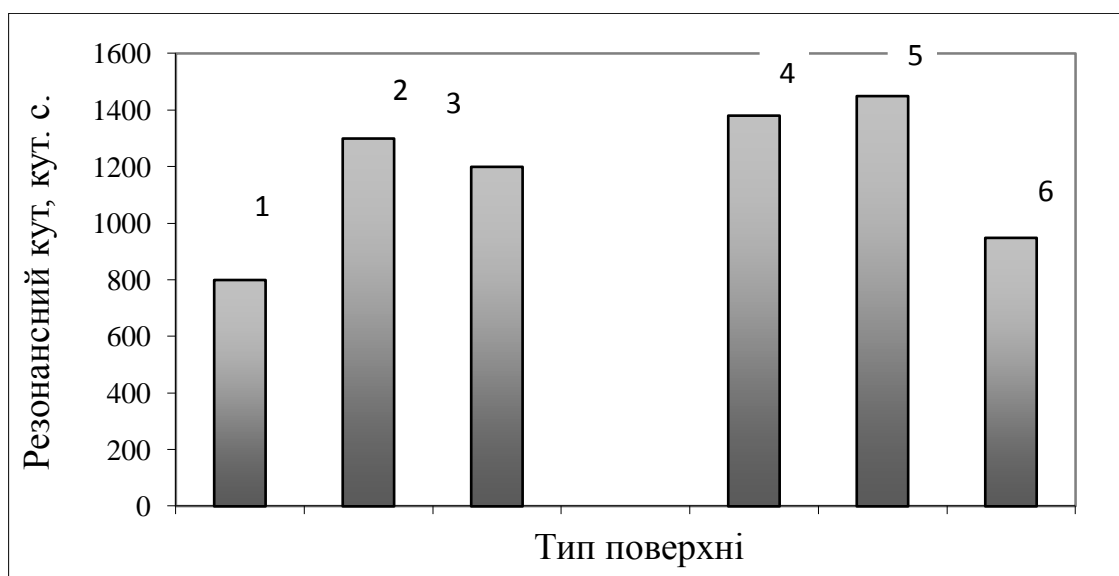
**Мета досліджень** – відпрацювати основні підходи функціоналізації трансдюсерних поверхонь для підвищення сигналу біосенсору для діагностики лейкозу ВРХ .

**Матеріали і методи досліджень.** Рекомбінантні антигени (gp51 та р24) були отримано від фірми „Діапрофмед”. Виміри взаємодії антигена з антитілами в досліджуваних пробах здійснювали за допомогою приладу на основі ППР, що розроблено в Інституті кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України. Для модифікації поверхні трансдюсера використовували додекантіол та поліелектроліти. Хімічну сорбцію додекантіолу

(HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>) проводили зануренням щойно виготовленої пластинки з нанесеним шаром золота в 1 мМ розчин етанолу при кімнатній температурі на 15 годин, після чого промивали чистим етанолом і висушували в потоці повітря. Поліелектролітна нерозчинна плівка на золотій поверхні формувалась з використанням поліаліламіну гідрохлориду (ПАА). Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/мл. Час експозиції розчину 30 хвилин при кімнатній температурі. Поверхню промивали дистильованою водою. У випадку використання декстрану сульфату (5 kDa) його розчин в 1 мМ трис HCl буфері, рН 4.0 при концентрації 2мг/мл наносили на поверхню і витримували там 25 хвилин, а потім поверхню промивали буфером.

**Результати досліджень.** Важливою вимогою до роботи біосенсора є стабільність і відтворюваність результатів. Тому одним з основних завдань, які повинні бути вирішені на шляху впровадження в практику розробленого нами біосенсорного методу діагностики ретровірусного лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) є забезпечення ефективної стандартизованої іммобілізації біологічного матеріалу та оптимізація функціональних параметрів ППР біосенсору.

Показано, що при адсорбції обох рекомбінантних антигенів (gp51 та p24) на поверхні перетворювача, вкритій шаром додекантіолу або поліелектроліту поліаліламіну (ПАА), не руйнується за промивання вимірювальної комірки ЗФР. Зміна резонансного кута коливалась в межах 1200-1500 кутових секунд. Разом з тим, показано, що в разі використання ПАА кількість антигену p24, сорбованого на поверхні була дещо більшою порівняно з необробленою поверхнею. Привертає увагу те, що у випадку антигену gp51 різниця між цими поверхнями відсутня. Кількість цього антигену, сорбованого на поверхні, вкритої шаром додекантіолу, по відношенню до непокритої поверхні, значно зменшується. Аналогічна ситуація спостерігалась і для поверхонь, вкритих ПАА та додекантіолом, виявлено, що в останньому випадку іммобілізація антигену gp51 відбувається зі значно меншою інтенсивністю, ніж на ПАА (рис. 1).



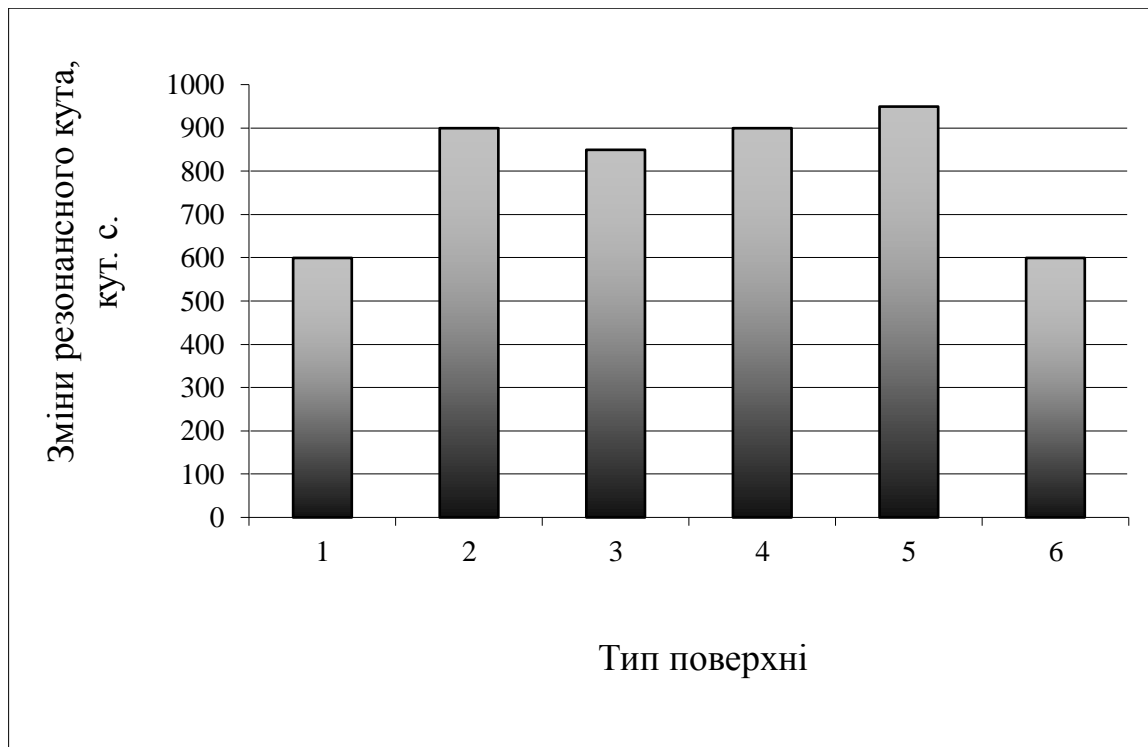
**Рис. 1.** Зміни резонансного кута при іммобілізації антигенів gp51 та p24 на різних типах поверхонь: 1,4 – необроблена поверхня; 2,

**5 – поверхня з шаром ПАА; 3, 6 – поверхня з шаром додекантіолу;  
1-3 – антиген р24; 4-5 – антиген гр51**

Майже у відповідності з кількістю попередньо іммобілізованого антигену спостерігались зміни відгуку імунного біосенсора при взаємодії із сироватками хворих тварин, що попередньо були діагностуванні в реакції імунодифузії чи імуноферментного аналізу (рис. 2). Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що в разі використання антигену р24 попередня обробка поверхні ПАА, або ж додекантіолом є такою, що може бути використана при наступному безпосередньому проведенні аналізу. Що ж до антигену гр51 то тут підходящими є необроблена поверхня, а також та, яка має шар ПАА.

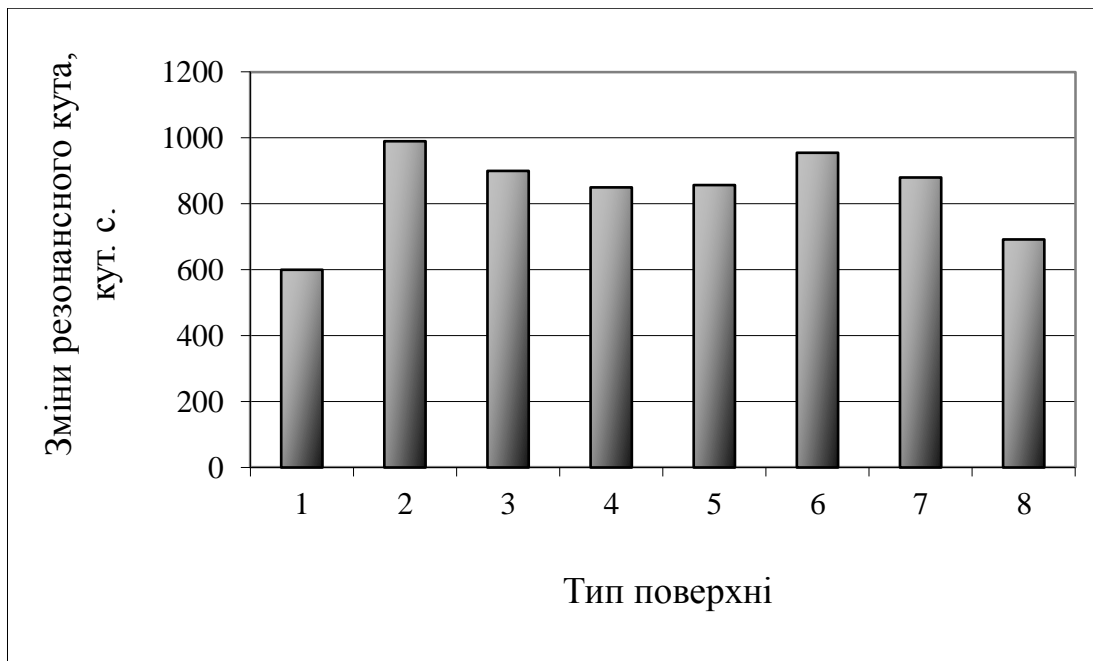
Обробка поверхні 1 % розчином БСА після сорбції антигену не вносить суттєвих змін у величину резонансного кута, що реєструється. Це, на нашу думку, означає, що на поверхні практично не залишались вільні місця зв'язування, а концентрація антигену була достатньою для створення максимально щільного шару.

Наступним етапом було абсорбція антигенів на поверхню, вкриту сульфатом декстрану. Така модифікація поверхні при використанні антигену р24 дозволяє підвищити як рівень резонансного кута, так і відповідно відгук імунного біосенсора майже в 2 рази порівняно з невідкритою поверхнею. В разі використання антигену гр51 ця різниця складає лише 20-30 %. Така ж різниця виявлена і по відношенню поверхонь, вкритих сульфатом декстрану та ПАА, коли використовували антиген р24 (рис. 3). Більша ефективність іммобілізації антигенів на поверхні, вкритій декстраном сульфату, в порівнянні з тим, коли на ній були присутні шари ПАА та додекантіолу, пов'язана з тим, що він формує розгалужений в просторовому відношенні шар, збільшуючи об'єм для сорбції антигену. Але використання декстрану сульфату, зважаючи на його коштовність та той незначний його внесок у відгук імунного біосенсора, на нашу думку не є перспективним і тому ми виключили в подальшому його з експериментальної роботи. Крім того, в наших експериментах поверхні, покриті декстраном сульфатом, не зберігали протягом довгого часу функціональної стабільності. На жаль, причина цього явища залишається невідомою і потребує подальших досліджень. Можливо, це пов'язано з якістю використовуваного нами препарату або ж з іншими причинами.



**Рис. 2. Зміни резонансного кута при взаємодії імунного біосенсора з сироватками хворих тварин. 1, 4 – необроблена поверхня; 2, 5 – поверхня з шаром ПАА; 3, 6 – поверхня з шаром додекантіола; 1-3 – антиген р24; 4-6 – антиген gr51**

Таким чином, було проаналізовано ефективність іммобілізації антигену вірусу лейкозу на поверхні перетворювача ППР, попередньо вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами та похідними декстрану). Оскільки чутливість та специфічність ППР імунного біосенсора є достатньо високою для проведення експресного аналізу проб щодо виявлення тварин хворих на лейкоз, то нема необхідності в застосуванні високовартісних сполук та ускладненні алгоритму проведення аналізу. Використання поліелектроліту ПАА для модифікації поверхні перетворювача імунного біосенсора на основі ППР є найбільш доцільним, дешевим і простим для обох рекомбінантних антигенів. Таким чином, для антигену gr51 можна використовувати і необроблену поверхню, а для антигену р24 і поверхню, яка містить шар додекантіолу. Але ці висновки є справедливими лише в тому випадку, якщо поверхня трансдюсера буде використана безпосередньо після її підготовки.



**Рис. 3. Зміни резонансного кута при взаємодії імунного біосенсора з сироватками хворих тварин. 1, 5 – необроблена поверхня; 2, 6 – поверхня з шаром сульфату декстрану 3, 7 – поверхня з шаром ПАА; 4, 8 – поверхня з шаром додекантіола; 1-4 – антиген р24; 5-8 – антиген gr51**

**Висновки і перспективи.** Порівнянням сигналів біосенсора на основі ППР після його функціоналізації рекомбінантними антигенами gr51 та р24 встановлено, що створення на поверхні трансдюсера проміжного шару взагалі, а особливо при використанні для цього ПАА (порівняно з додекантіолом) дозволяє не лише збільшити відгук, а й досягти його необхідної відтворюваності впродовж принаймні 4-х місяців. Похідні декстрану також збільшують відгук біосенсора, але не забезпечують його стабільності при зберіганні функціоналізованої поверхні.

#### References

1. Gulyukin, M. I., Zamaraeva, N. V., Abramov, V. N., Barabanov, N. I. (1999). Sostoyanie i perspektiva borby s leykozom krupnogo rogatogo skota [The state and prospects of combating leukemia of cattle]. Veterinariya, 12, 3-8.
2. Mandigra, M. (2000). Genetichni aspekti leykozu velikoyi rogatoyi hudobi [Genetic aspects of leukemia in cattle]. Vet. med. UkraYini, 18-19.
3. Yarchuk, B. M., Dombrovskiy, O. B., Tirsln, R. V., Kornienko, L. E., Dovgal, O. V. (2000). Leykoz velikoyi rogatoyi hudobi [Leukemia of cattle]. Kyiv: Biblioteka vet. med., 9-12, 62 s.
4. Pirogova, L. V., Starodub, M. F., Artyuh, V. P., Nagaeva, L. I., Dobrosol, G. I. (2002). Ekspresna diagnostika leykozu velikoyi rogatoyi hudobi za dopomogyu imunnogo sensora na osnovi poverhnevogo plazmonnogo rezonansu [Extreme diagnosis of leukemia in cattle using an immune sensor based on surface plasmon resonance]. Ukr. vshohsh. Zhurn, 74, 3, 88 – 92.
5. Starodub, N. F., Pirogova, L. V. (2003). Instrumentalnaya ekspres-diaagnostika leykozov na osnove biosensornoy tehnologii [Instrumental express diagnostics of leukemia based on biosensor technology]. Sbornik: «Bioresursyi, biotehnologii, innovatsii yuga Rossii», Materialyi Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii 21-24 oktyabrya 2003, Stavropol Pyatigorsk, 2, 144-149.

6. Starodub, M. F., Pirogova, L. V. (2007). Sposib neinvazyynoyi diagnostiki leykozu velikoyi rogotoyi hudobi shlyahom viznachennya antitil do virusu u molotsi koriv imunosensorom poverhnevogo plazmonnogo rezonansu [Method of non-invasive diagnosis of bovine leukemia by detection of antibodies to a virus in milk of cows with an immunosensor of surface plasmon resonance]. Patent Ukrayini na vinahid, №12689/3730, Byul. vld 23.11.2007.

7. Starodub, N. F., Starodub, V. N. (2003). Infektsionnyiy leykoz krupnogo rogotogo skota i ego diagnostika [Infectious leukemia of cattle and its diagnosis]. Biopolimeryi i kletka, 19,4, s. 307-316.

## **МОДИФИКАЦИЯ ТРАНСДЮСЕРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ППР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРС**

**М. Ф. Стародуб, М. И. Феделеш-Гладинец, М. В. Савчук**

**Аннотация.** Лейкоз БРС – широко распространенная хроническая болезнь опухолевой природы, протекает бессимптомно или характеризуется лимфоцитозом и ростом лимфоидных клеток в различных органах животных. Такая болезнь приносит огромные убытки в сельскохозяйственных хозяйствах. Основным мероприятием для преодоления этой болезни является своевременная диагностика и лечение. Общепринятыми методами диагностики лейкоза есть методы РИД и ИФА. Однако эти методы являются долговременными и требуют исследований в лаборатории. Поэтому в настоящее время актуальным является разработка новых приборов для экспресс-диагностики состояния животных в полевых условиях. Целью работы было отработать основные подходы функционализации трансдюсерных поверхностей для повышения сигнала биосенсоров для диагностики лейкоза БРС. В работе использовали иммунологические и статистические методы исследований. Сравнением сигналов биосенсора на основе ППР после его функционализации рекомбинантными антигенами gr51 и r24 установлено, что создание на поверхности трансдюсера промежуточного слоя вообще, а особенно при использовании для этого ПАА (сравнительно с додекантиолом) позволяет не только увеличить отклик, но и достичь его необходимой воспроизводимости на протяжении по крайней мере 4-х месяцев. Производные декстрана также увеличивают отзыв биосенсора, но не обеспечивают его стабильности при хранении функционализированной поверхности.

**Ключевые слова:** биосенсор, лейкоз крупного рогатого скота, трансдюсер, антиген, додекантиолом, декстран, полиалиламин

## **MODIFICATION OF TRANSDUSER SURFACE OF BIOSENSORS ON THE BASIS OF PPR FOR DIAGNOSTICS OF LEUCOSE CATTLE**

**M. F. Starodub, M. I. Fedesh-Gladinets, M. V. Savchuk, O. P. Taran**

**Annotation.** Leucosis of BLV is a widespread chronic disease of the tumor nature, occurs asymptotically or is characterized by lymphocytosis and growth of lymphoid cells in various organs of animals. Such a disease brings huge

losses in agricultural holdings. The main measure for overcoming this disease is timely diagnosis and treatment. Common methods of diagnosing leukemia are the methods of RID and ELISA. However, these methods are long-term and require research in the laboratory. Therefore, at present, it is urgent to develop new instruments for rapid diagnosis of the condition of animals in the field. The aim of the work was to work out the main approaches to the functionalization of transducer surfaces to increase the biosensor signal for the diagnosis leucosis of BLV . Immunological and statistical methods of research were used in the work. By comparing the signals of the biosensor based on PPR after its functionalization with recombinant antigens gp51 and p24, it was established that the creation of an intermediate layer on the surface of the transducer in general, and especially when using PAA (level with dodecanthiol) allows not only to increase the response, but also to achieve its necessary reproducibility on for at least 4 months. Derivatives of dextran also increase the recall of the biosensor, but do not ensure its stability during storage of the functionalized surface.

**Keywords: biosensor, leukosis of cattle, transducer, antigen, dodecanthiol, dextran, polyalilamine**