

ФОРМУВАННЯ ПОВЕРХНЕВО ЗАПРОГРАМОВАНИХ ХІМІЧНИХ САЙТІВ І ШЛЯХИ ОЦІНЮВАННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ ДО ОКРЕМИХ МІКОТОКСИНІВ

М. Ф. СТАРОДУБ, доктор біологічних наук, професор

М. В. САВЧУК, молодший науковий співробітник

М. І. ФЕДЕЛЕС-ГЛАДИНЕЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: nfstarodub@gmail.com, taranMaruna@gmail.com

Анотація. Проблема мікотоксинів як потенційних забруднювачів продуктів харчування набула масштабного характеру через порушення вимог при інтенсивних технологіях оброблення сільськогосподарських культур та втрату рослинами стійкості до фітопатогенів. Зростання вмісту мікотоксинів у продуктах харчування також безпосередньо пов'язане з неконтрольованим використанням азотних добрив і пестицидів. У статті наведено експериментальні дослідження щодо пошуку найбільш ефективних шляхів формування селективних хімічних сайтів, спрямованих на кількісне визначення окремих мікотоксинів з використанням сенсорної технології. Установлено, що реєструвати утворення відповідного специфічного комплексу можна потенціометричним та оптичним шляхом на основі принципу ППР. Виявлено, що в разі реєстрації утворюваного специфічного комплексу за принципом ППР трансдюсерну поверхню має бути попередньо оброблено ПАА. Відпрацьований спосіб формування селективних матрично-запрограмованих поверхонь можна рекомендувати для створення трансдюсерних поверхонь сенсорів, спрямованих на скринінг мікотоксинів серед об'єктів довкілля. Визначено, що запрограмовані поверхневі структури можуть бути відновлені для повторного використання після промивання їх ацетонітрилом чи метанолом. При повторному використанні понад 10 разів специфічний сигнал змінюється лише в межах 10%.

Ключові слова: біосенсор, мікотоксини, сілан, трансдюсер, поверхневоплазмонний резонанс.

Актуальність. З кожним роком проблема мікотоксикозу загострюється, токсикогени (гриби, які утворюють токсини) швидко пристосовуються до нових технологій і сучасних пестицидів, при цьому збільшують утворення мікотоксинів у сотні разів [1]. На сьогодні немає ефективних хімічних способів боротьби з ураженнями мікотоксинами продуктів різних культур, саме тому для вчасної діагностики мікотоксикозів у сільському господарстві необхідною є розроблення нових методів експресної біосенсорної діагностики наявності мікотоксинів у сільськогосподарській продукції [2, с.81-101; 3, с.885-890; 4, с. 81-101; 5, с. 5-12].

Розподіл між фізичною поверхнею та хімічними або біологічними структурами, які є чутливими елементами щодо аналізованих речовин, особливо важливий для всіх біосенсорних систем. Чутливі селективні елементи мають бути приєднані до твердотільної підкладки при збереженні їхньої природної конформації та активності. Це приєднання має бути стабільним протягом усього періоду аналізування, і, крім того, достатня кількість активних сайтів має бути орієнтована в розчин для взаємодії з речовиною, яка піддається аналізу. Надзвичайно важливим є й те, щоб сама поверхня підкладки залишалася нездатною до неспецифічного зв'язування аналізованої речовини, що унеможливило б появу хибно позитивного сигналу. Для досягнення бажаного ефекту використовують підходів низку способів, зокрема вводять хімічну проміжну або лінкерну плівку між поверхнею фізичного перетворювача та селективними елементами.

Є багато варіантів для ковалентного або нековалентного приєднання селективного матеріалу до планарно-самозбираних плівок або полімерним покриттям на поверхні трансдюсера [1, с.106-115].

Останнім часом особлива увага приділяється можливості заміни біологічних селективних центрів на штучні структури типу матрично-запрограмованих поверхонь, хімічно створених та включених у полімер сайтів, а також структур типу аптамерів і деяких типів каліксеренів, оскільки ці матеріали дають змогу покращити чутливість і витривалість біосенсорного зразка.

Саме тому **метою роботи** є експериментальні дослідження щодо пошуку найбільш ефективних шляхів формування селективних хімічних сайтів, спрямованих на кількісне визначення окремих мікотоксинів з використанням сенсорної технології.

Матеріали та методи дослідження. У дослідженнях використано низку мікотоксинів, а саме: Т2, патулін, афлатоксин В1 та зеареленон. Реєстрували специфічний сигнал на основі оптичних засобів з використанням принципу поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

Кремнієві пластини і такі ж пластини, але з нанесеним тонким шаром золота, а обробляли гарячою парою протягом 1 год. Потім їх поміщали в розчин 5 мМ речовини, що визначалась, на 12 год. Після видалення надлишку розчину пластини сушили за температури 120°C протягом 3 год, а потім поміщали у вакуумні умови разом з 5 мл замороженого триметил-хлорсилану і витримували за кімнатної температури протягом 12 год. Структури промивали водою і етанолом. Контрольні зразки було виготовлено без використання досліджуваних структур. В окремих випадках пластини з шаром золота попередньо до формування на них «темплати» обробляли поліаліламіном гідрохлоридом (ПАА) [1, с. 106-115].

Для біосенсорних досліджень було використано реєстрацію специфічного сигналу лише двома способами, а саме електрохімічним (потенціометричним) шляхом і оптичним способом з використанням принципу ППР [2, с. 81-101].

Експериментальна установка, яку застосовували для дослідження провідності шару на поверхні електрода, складалася з потенціостата, електрохімічної комірки та самописного пристрою. Тефлоновий зонд з інжектором і насиченим Ag/AgCl електродом був використаний для реалізації

потоків вприскування та функціонування електрохімічної комірки. Ця конструкція дає змогу рідині аналіту швидко розміститися навколо поверхні електрода та бути швидко зміненою. Робоча поверхня зонда була в межах 0,75см². Виміри проводилися з тріс-НCl буфері, що слугував фоновим електролітом. Концентрації аналітів були в межах 10-100нг/мл. Робочий електрод був при +0.9V (відповідно до Ag/AgCl електрода).

Результати експериментальних досліджень. *Аналіз селективності зв'язування окремих мікотоксинів з матрично-запрограмованими поверхнями у вигляді кремнієвих пластин.*

Установлено, що ефект детекції Т2 мікотоксину наближався до 95% попередньо заданої концентрації, визначеної за калібрувальною кривою, побудованою на основі імунобіосенсорного аналізу з використанням принципу ППР.

Для інших видів мікотоксинів цей рівень коливався в межах 10%, але не перевищував 15% (табл. 1), що свідчило про досить високу специфічність створених штучних сайтів на основі матрично-запрограмованих структур, оскільки навіть імунобіосенсорний аналіз цих мікотоксинів з використанням поліклональних антитіл характеризувався рівнем перехресних реакцій, що наближався до зазначеного вище (табл. 2).

1. Рівень перехресних реакцій окремих мікотоксинів при використанні як селективних зв'язуючих сайтів матрично-запрограмованих поверхонь до Т2 мікотоксину

№	Сполуки	Перехресні реакції, %
1	Патулін	10-15
2	Т2	90-95
3	Афлатоксин В1	10-15

Отримані дані вказують на перспективність використання створених штучних сайтів на основі матрично-запрограмованих структур у сенсорних аналітичних пристроях, призначених передусім для експресних скринінгових обстежень.

2. Рівень перехресних реакцій окремих мікотоксинів при використанні як селективних зв'язуючих сайтів поліклональних антитіл, специфічних до Т2 мікотоксину

№	Сполуки	Перехресні реакції, %
1	Патулін	100
2	Т2	5
3	Афлатоксин В1	10
4	Зеареленон	7
5	Фталат	0

Таким же шляхом проаналізовано рівень селективності створених штучних і сайтів на основі матрично-запрограмованих структур при визначенні афлатоксину В1. Оцінювання здійснювалось на основі кількісних характеристик виявлення зазначеного вище мікотоксину та низки таких токсинів, як

зеареленон, мікотоксин Т2 і патулін. Установлено, що ефект детекції афлатоксину В1 наближався до 90% попередньо заданої концентрації, визначеної за калібрувальною кривою, побудованою на основі імунобіосенсорного аналізу. Для інших видів мікотоксинів цей рівень коливався в межах 15%, але не перевищував 20%, що свідчило про значну специфічність створених і штучних сайтів на основі матрично-запрограмованих структур. Треба зазначити, що в разі створення матрично-запрограмованих структур до афлатоксину В1 їхня специфічність до нього була дещо меншою, ніж створених до Т2 мікотоксину. Причому аналогічна ситуація спостерігається і в разі імунобіосенсорного аналізу цих мікотоксинів з використанням поліклональних антитіл, який характеризувався рівнями перехресних реакцій, що наближалися до зазначених вище. Отримані дані вказують на перспективність використання створених штучних сайтів на основі матрично-запрограмованих структур у сенсорних аналітичних пристроях, призначених передусім для експресних скринінгових обстежень.

Аналіз селективності зв'язування окремих мікотоксинів з матрично-запрограмованими пластинами з умістом тонкого шару золота

Використання тонкого шару золота на кремнієвій поверхні є необхідною умовою для проведення досліджень на основі ефекту ППР. Шар золота має гідрофобні властивості і це узгоджується з аналізом мікотоксинів, які теж є загалом гідрофобними. Мікотоксини містилися в розчині ацетальдегіду, який може містити гідрофобні сполуки. Разом з тим сіланові сполуки, які є чинниками обмеження геометричної та структурної поверхні, є проміжними в цьому відношенні. Зменшення рівня гідрофільності поверхні призводить до обмеження їх сорбції на ній. Так установлено, що рівень сорбції сіланових сполук значно підвищується на поверхні за її попередньої модифікації поліелектролітами, а саме ПАА (табл. 3). Отримані дані свідчать, що сорбція мікотоксину Т2 зменшується на поверхні, попередньо обробленій ПАА, порівняно з необробленою. Разом з тим кількість сілану, сорбованого на ПАА оброблену поверхню, збільшується, що вказує на його можливу участь у формуванні матричних структур для мікотоксину Т2.

У наступних дослідженнях ми оцінили чутливість аналізу мікотоксину Т2 за умови використання матрично-запрограмованих для нього структур на поверхні ППР-трансдюсера.

3. Зміни кута відбивання ППР при внесенні сіланових сполук і мікотоксину Т₂ до та після оброблення шару золота за допомогою ПАА

№	Відносні зміни кута відбивання (5) ППР при сорбції:	
1	Мікотоксин Т2	0,65
2	Мікотоксин Т2+сілан	0,70
3	ПАА+мікотоксин Т2	0,49
4	ПАА+мікотоксин Т2+сілан	0,80

На наступній стадії досліджень було оцінено чутливість аналізу мікотоксину Т2 з використанням відповідних до нього поверхнево матричних структур, а також рівень перехресних реакцій цих структур до афлатоксину В1. Ці експерименти проводили з поверхнями золотого шару, попередньо

обробленими за допомогою ПАА. Отримані результати подано в таблиці 4. Виявилось, що зазначеним способом вдасться зареєструвати мікотоксин Т2 лише за мінімальної концентрації понад 100нг/мл, а перехресна відповідь на афлатоксин В1 досягає лише на рівні 15-25% від специфічної, причому цей мікотоксин можна виявити лише за концентрації, яка перевищує 1мкг/мл.

4. Відносні зміни рефлекторного кута ППР при визначенні Т2 та афлатоксину В1 на матрично-запрограмованих поверхнях до Т2 мікотоксину та попередньо оброблених ПАА

№	Концентрація Т2 мікотоксину, нг/мл	Відносні зміни рефлекторного кута	Концентрація афлатоксину В1, нг/мл	Відносні зміни рефлекторного кута
1	10	-	10	-
2	50	-	50	-
3	100	5	100	-
4	200	9	200	-
5	500	15	500	-
6	1000	15	1000	5

Варто зазначити, що закономірність, аналогічна наведеній вище, багато в чому збігається і з тією, коли афлатоксин В1 слугував базовою структурою. Деякі відхилення спостерігались лише в рівнях відхилення рефлекторного кута.

У попередніх дослідженнях було показано, що запрограмовані поверхневі структури можуть бути відновлені для повторного використання після промивання їх ацетонітрилом, метанолом. Визначено, що повторне використання можливе понад 10 разів зі зменшенням специфічного сигналу в межах 10%.

Висновки та перспективи. Відпрацьовано шляхи формування матрично-запрограмованих структур для визначення таких мікотоксинів, як Т2 та афлатоксин В1. Установлено, що утворення відповідного специфічного комплексу можна реєструвати потенціометричним та оптичним шляхом на основі принципу ППР. Виявлено, що в разі реєстрації утворюваного специфічного комплексу за принципом ППР трансдюсерну поверхню має бути попередньо оброблено ПАА. Відпрацьований спосіб формування селективних матрично-запрограмованих поверхонь можна рекомендувати для створення трансдюсерних поверхньосенсорів, спрямованих на скринінг мікотоксинів серед об'єктів довкілля. Визначено, що запрограмовані поверхневі структури можуть бути відновлені для повторного використання після промивання ацетонітрилом чи метанолом. При повторному використанні понад 10 разів специфічний сигнал змінюється лише в межах 10%.

Список використаних джерел

1. Стародуб Н.Ф. Аналіз микотоксинов: подготовка проб / Н. Ф. Стародуб, Л. Н. Пилипенко, А. В. Егорова, И. В. Пилипенко, О. С. Гойстер, Г. О. Хмельницкий // Биотехнология. – 2008. – Т. 1, №1. – С. 106-115.

2. Starodub N.F. Biosensors for the Determination of Mycotoxins: development, efficiency at the analysis of model samples and in case of the practical applications / N.F. Starodub, I.V. Pylypenko, L.N. Pylypenko, M. M. Mel'nichenko, A.V. Nabok // *Lecture Notes of the ICB*. – 2010. – 86. – P. 81-101.

3. Nabok A.V. Registration of T-2 mycotoxin with total internal reflection ellipsometry and QCM impedance methods / A.V. Nabok, A. Tsargorodskaya, A. Holloway, N.F. Starodub, O. Gojster // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – №22. – P. 885-890.

4. Starodub N. F. Fiber optic SOS-type biosensor for the control of the genotoxicity of some environmental objects / Starodub N. F., Taran M. V., Shpirka N. F., Shavanova K. E. // *World journal of engineering research and technology*. – 2016. – Vol. 2. – P. 123-130.

5. Smirnov V. Mycotoxins: fundamental and applied aspects / V. Smirnov, F. Zajchenko, I. Rubegnjak // *Modern problems of toxicology*. – 2000. – №1. – P. 5-12.

References

1. Starodub N. F., Pilipenko L. N., Egorova A. V., Pylypenko I. V., Goyster O. S., Khmel'nitsky G. O. (2008). Analiz micotoxinov: podgotovka prob [Mycotoxin analysis: preparation of samples]. *Biotechnology*. Vol. 1, No. 1. - P. 106-115.

2. Starodub N.F., Pylypenko I.V., Pylypenko L.N., Mel'nichenko M. M., Nabok A.V. (2010). Biosensors for the Determination of Mycotoxins: development, efficiency at the analysis of model samples and in case of the practical applications. *Lecture Notes of the ICB*, 86. P. 81-101.

3. Nabok A.V., Tsargorodskaya A., Holloway A., Starodub N.F., Gojster O. (2007). Registration of T-2 mycotoxin with total internal reflection ellipsometry and QCM impedance methods. *Biosensors and Bioelectronics*, №22. P. 885-890.

4. Starodub N. F., Taran M. V., Shpirka N. F., Shavanova K. E. (2016). Fiber optic SOS-type biosensor for the control of the genotoxicity of some environmental objects. *World journal of engineering research and technology*, Vol. 2. P. 123-130.

5. Smirnov V., Zajchenko F., Rubegnjak I. (2000). Mycotoxins: fundamental and applied aspects. *Modern problems of toxicology*, №1. P. 5-12.

ФОРМИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНО ЗАПРОГРАММИРОВАННЫХ, ХИМИЧЕСКИ СОЗДАНЫХ САЙТОВ И ПУТИ ОЦЕНКИ ИХ СЕЛЕКТИВНОСТИ К РАЗНЫМ МИКОТОКСИНАМ

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

Аннотация. Проблема микотоксинов как потенциальных загрязнителей продуктов питания приобрела масштабный характер из-за нарушения требований при интенсивных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур и потери растениями устойчивости к фитопатогенам. Рост содержания микотоксинов в продуктах питания также напрямую связан с неконтролируемым использованием азотных удобрений и пестицидов. В статье представлены экспериментальные исследования по поиску наиболее эффективных путей формирования селективных химических сайтов, направленных на количественное определение отдельных микотоксинов с использованием сенсорной технологии. Установлено, что регистрация образования соответствующего специфического комплекса может быть осуществлена потенциометрическим и оптическим путем на основе принципа ППР.

Выявлено, что при регистрации создаваемого специфического комплекса за принципом ППР трансдюсерная поверхность должна быть предварительно обработана ПАА. Отработанный способ формирования селективных матрично-запрограммированных поверхностей можно рекомендовать для создания трансдюсерных поверхностных сенсоров, направленных на скрининг микотоксинов среди объектов окружающей среды. Определено, что запрограммированные поверхностные структуры могут быть восстановлены для повторного использования путем их промывки ацетонитрилом или метанолом. При повторном использовании более 10 раз специфический сигнал изменяется только в пределах 10%.

Ключевые слова: биосенсор, микотоксины, силан, трансдюсер, поверхностноплазмонный резонанс.

FORMATION OF SURFACELY PROGRAMMED, CHEMICAL CREATED SITES AND WAYS OF ESTIMATION OF THEIR SELECTIVITY TO DIFFERENT MYCOTOXINES

M. Starodub, M. Savchuk, M. Fedelesh-Gladinets

Abstract. The problem of mycotoxins as potential food contaminants has become widespread in violation of the requirements of intensive processing technologies for agricultural crops and the loss of plant resistance to phytopathogens. Growth in the content of mycotoxins in food is also directly related to the uncontrolled use of nitrogen fertilizers and pesticides. The article presents experimental studies on the search for the most effective ways of forming selective chemical sites aimed at quantifying individual mycotoxins using sensory technology. It has been established that the registration of the formation of the corresponding specific complex can be carried out potentiometrically and optically on the basis of the PPR principle. It was revealed that when registering the specific complex created for and using the PPR principle, the transducer surface must be pretreated with PAA. A tried-and-true method of forming selective matrix-programmed surfaces can be recommended for the sake of terrestrial transducer surface sensors aimed at screening mycotoxins among environmental objects. It is determined that the surface structures programmed can be restored for reuse by washing them with acetonitrile or methanol. When reused more than 10 times the specific signal changes only within 10%.

Keywords: biosensor, mycotoxins, silane, transducer, surface-plasmon resonance.