

УДК 543.9+621.3.082.73+57.083.3

Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики

Т. Н. Ермолаева, Е. Н. Калмыкова, О. Ю. Шашканова

ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА ЕРМОЛАЕВА — доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой химии Липецкого государственного технического университета. Область научных интересов: аналитическая химия, экстракция, пьезокварцевые химические сенсоры и биосенсоры для анализа газовых и жидких сред.

ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА КАЛМЫКОВА — кандидат химических наук, доцент кафедры химии Липецкого государственного технического университета. Область научных интересов: структурные и иммунохимические исследования углеводсодержащих биополимеров, пьезокварцевые биосенсоры для анализа жидких сред.

ОЛЬГА ЮРЬЕВНА ШАШКАНОВА — аспирант Липецкого государственного технического университета. Область научных интересов: пьезокварцевые биосенсоры (иммуносенсоры, ДНК-сенсоры) для клинической диагностики.

398060 г. Липецк, ул. Московская, 30, Липецкий государственный технический университет, факс (0742)310-473, E-mail ermolaeva@stu.lipetsk.ru

Введение

Пьезокварцевый биосенсор представляет собой аналитическое устройство, чувствительным элементом которого является пьезокварцевый резонатор с электродами, покрытыми рецепторными молекулами. Аналитическим сигналом пьезокварцевых сенсоров наиболее часто служит уменьшение частоты колебаний резонатора при увеличении массы рецепторного слоя в результате взаимодействия его с определяемым соединением. Это так называемые гравиметрические сенсоры.

Пьезокварцевые биосенсоры позволяют осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных, радиоактивных, люминесцентных и др.), что выгодно отличает их от аналогичных устройств. Они характеризуются малой инерционностью, легкостью в эксплуатации, портативностью, возможностью включения в мультисенсорные системы, а также в автоматические системы сбора и обработки информации. Уникальной особенностью пьезокварцевых биосенсоров является сочетание высокой чувствительности, обеспечиваемой использованием в качестве физического преобразователя пьезокварцевого резонатора, и селективности, определяемой природой применяемых рецепторных молекул.

Для повышения селективности и расширения круга анализируемых веществ (например, в области медицины, ветеринарии, фармакологии, молекулярной био-

логии, биотехнологии и др.) покрытия электродов пьезокварцевых биосенсоров формируют из природных биораспознающих соединений, отличающихся уникально высокой избирательностью взаимодействия. Такими соединениями являются специфические функциональные белки — антитела и ферменты, нуклеиновые кислоты ДНК и РНК, антигены и гаптены (низкомолекулярные вещества, специфически связывающиеся с антителами, но не вызывающие их образование в организме высших животных) различной природы, в том числе гаптен-белковые конъюгаты.

Соответственно в зависимости от класса используемых рецепторных макромолекул сенсоры получили название иммуно-, энзимо-, ДНК- и аптасенсоров. Наряду с природными биоселектирующими молекулами, применяют их синтетических аналоги — полимеры с молекулярными отпечатками, которые часто называют имитаторами антител.

К настоящему времени наиболее широкое распространение среди гравиметрических биосенсоров получили иммуносенсоры, высокая избирательность и чувствительность которых обусловлена использованием в качестве ключевых реагентов антител — защитных белков, которые образуются в организме высших животных в ответ на введение чужеродных агентов — антигенов. Как в живом организме, так и вне его антитела способны образовывать иммунные комплексы антиген-антитело преимущественно с комплементарным антигеном, несмотря на присутствие большого числа других компонентов анализируемой пробы.

Рассмотрению теоретических аспектов функционирования пьезокварцевых биодатчиков и особенностей их практического использования при определении разнохарактерных аналитов посвящен ряд обзорных публикаций [1—6].

Чувствительность пьезокварцевых детекторов сопоставима, а в некоторых случаях превышает аналогичные характеристики оптических, спектрофотометрических, электрохимических, флуоресцентных, иммуноферментных и других методов регистрации иммунохимических взаимодействий, несколько уступая лишь рефлектометрии [3, 4]. В отличие от классических серологических методов, основанных на иммунохимических взаимодействиях (реакция агглютинации, реакция непрямой, или пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ и др.), в которых предусматривается одноразовое применение реагентов, иммуносенсоры могут использоваться многократно после регенерации биослоя на электроде. Таким образом, целесообразно их более широкое внедрение для проведения рутинных анализов, так как при этом существенно снижается стоимость единичного определения. Присутствие органических растворителей, уменьшающих, как правило, чувствительность методов с использованием меток, не представляет опасности для непосредственного взаимодействия антител и антигенов, регистрируемого пьезокварцевым детектором [5]. Поэтому в методиках анализа с использованием пьезокварцевых иммуносенсоров для снижения предела обнаружения определяемых соединений возможно проведение предварительного экстракционного концентрирования.

В предлагаемом обзоре показаны возможности и особенности практического применения гравиметрических биосенсоров для определения высоко- и низкомолекулярных биологически активных веществ и микроорганизмов в анализе объектов окружающей среды, пищевых продуктах и в клинической диагностике.

Типы пьезокварцевых биосенсоров

Гравиметрические пьезокварцевые сенсоры

Гравиметрические пьезокварцевые сенсоры обычно выполняются в виде тонкого диска из кристалла кварца (диаметр 5—16 мм), на обеих сторонах которого путем термического напыления сформированы электроды из различных металлов — золота, серебра, алюминия, никеля, хрома (рис. 1). Пьезоэлектрически активна только область между электродами, по мере удаления от центра диска колебания резко убывают и чувствительность резонатора существенно снижается.

Практическое распространение получили высокочастотные (5—15 МГц) пьезокварцевые резонаторы, изготовленные из АТ-среза кристалла кварца (наиболее термостабильные в интервале от 10 до 50 °С), обычно применяемые в качестве пьезоэлектрических детекторов для контроля толщины пленок, а также в качестве высокочувствительных микро- и нановесов. На основе

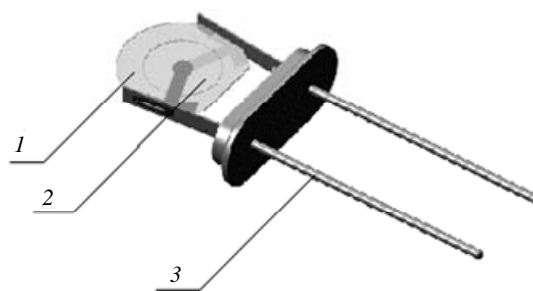


Рис. 1. Пьезокварцевый резонатор из АТ-среза кристалла кварца:

1 — шлифованная пластина из α -кварца, срезанная под углом $35^{\circ}15'$; 2 — металлический электрод; 3 — выводные контакты

таких резонаторов разработаны гравиметрические биосенсоры, реализующие высокоспецифичные взаимодействия: антитела—антигены; ферменты—субстраты (или эффекторы—ингибиторы и активаторы); рецепторы—лиганды (гормоны, цитокинины); авидин—биотин; протеин А—антитела; ДНК—ДНК или РНК; транспортные белки—различные молекулы и ионы) [1, 7—9]. Эти биосенсоры могут найти применение для проведения медико-биологических обследований, а также для санитарно-гигиенического контроля и сертификации качества пищевых продуктов, фармацевтических препаратов, для анализа объектов окружающей среды на содержание токсикантов, пестицидов и бактериальных загрязнителей.

Энзимосенсоры

В таких устройствах в качестве биораспознающих компонентов используются ферменты различной специфичности: протеазы, дегидрогеназы, оксидоредуктазы, эстеразы и др. С их помощью можно определять субстраты и эффекторы ферментов. Известно, что во многих ферментативных реакциях масса исходного субстрата уменьшается за счет выделения газов или увеличивается в результате выпадения осадка. Кроме того, действие некоторых ингибиторов приводит к их связыванию с активным центром фермента, что также вызывает увеличение массы биокомпонента.

В 80—90 гг. прошлого века появились работы Гульбо с соавт. [10—15] по использованию в качестве покрытия пьезокварцевого сенсора пленок на основе формальдегиддегидрогеназы и ацетилхолинэстеразы. Эти биосенсоры предназначаются, в частности, для контроля за содержанием паров фосфорорганических соединений в воздухе. Было высказано предположение, что присутствующие в пленке молекулы воды поддерживают конформацию активного центра молекул ферментов, что обеспечивает специфические взаимодействия с определяемыми веществами в газовой фазе [16]. Однако эта гипотеза рядом исследователей не была поддержана.

ДНК-сенсоры

В ДНК-сенсорах в качестве рецепторных молекул применяются ДНК (двухцепочечные или одноцепочечные). Такие сенсоры предназначены для определения специфических антител, выявляемых при аутоиммунных патологиях [17, 18], а также и для изучения процессов гибридизации [19] при выявлении генетически модифицированных организмов в пищевой продукции.

Апта-сенсоры

Применение для аффинного взаимодействия аптамеров — молекул некоторых пептидов, коротких полимеров нуклеиновых кислот ДНК или РНК, а также их фрагментов (линейных олигонуклеотидов) — явилось началом разработки апта-сенсоров. По специфичности взаимодействий аптамеры подобны антителам, но отличаются большей устойчивостью и способностью к обратимой денатурации, осуществляемой в течение нескольких минут. Аптамеры применяются при изучении биохимических процессов, например специфического распознавания белок—нуклеиновая кислота [20, 21]. Поэтому развитие этого направления может стать реальной альтернативой высокочувствительным и селективным иммуносенсорам для проведения экологического мониторинга токсикантов, генетических исследований, клинической диагностики и терапии инфекционных и соматических заболеваний, в том числе онкологических.

Иммуносенсоры

В работе иммуносенсоров обязательно принимают участие антитела, выступающие в качестве определяемых соединений или распознающих молекул. В последнем случае их иммобилизуют на сенсоре или вводят в пробу при выполнении конкурентного формата анализа. Для создания рецепторных покрытий иммуносенсора используют различные по природе биологически активные вещества: гаптен-белковые конъюгаты (с белковыми молекулами связаны низкомолекулярные вещества — салициловая кислота, сульфаниламиды, атразин, кокаин и др.), белки (антитела и рекомбинантные фрагменты антител); синтетические пептиды (например, HIV-пептид), липополисахариды, вирусы, клетки и т.д.

Ранние попытки применения пьезокварцевых сенсорных систем для измерений в жидких средах были неудачными, так как кристалл кварца при погружении в анализируемый раствор прекращал осциллировать. Поэтому при выполнении анализа сенсор выдерживали в жидкой фазе (анализируемом растворе), а приращение массы биослоя регистрировали в газовой фазе [16, 22—24]. Позднее были предложены устройства, обеспечивающие измерение непосредственно в жидкости, при этом сенсор контактирует лишь одной стороной с анализируемым раствором [2, 25—27]. Решение проблемы оказалось настолько удачным, что предложенный подход получил широкое распространение, поскольку позволяет наблюдать за ходом биохимической реакции

в режиме реального времени. В современных анализаторах жидкостей пьезокварцевые биосенсоры обычно используют в качестве детекторов в проточно-инжекционном анализе.

Способы формирования биораспознающего слоя сенсора

Эффективность работы пьезокварцевого иммуносенсора (чувствительность, селективность, воспроизводимость результатов определения, продолжительность эксплуатации) в первую очередь определяется качеством биорецепторного слоя [28], к которому предъявляются следующие требования:

- сохранение высокой активности иммобилизованных биомолекул;
- равномерность распределения активных центров связывания по всей площади электрода пьезокварцевого резонатора;
- физическая и химическая стойкость покрытия при контакте с жидкостью, включая устойчивость к регенерации;
- минимальная масса рецепторного слоя, обеспечивающая возможность регистрации большей величины приращения массы сорбируемого аналита.

При выборе способа иммобилизации биомолекул необходимо учитывать природу металла, из которого сформирован электрод резонатора. Наиболее часто используются пьезокварцевые резонаторы с золотыми электродами. Однако в последнее время кристаллы кварца с серебряными электродами становятся весьма привлекательными из-за их относительно низкой стоимости [29, 30].

Для закрепления биомолекул на поверхности пьезокварцевого сенсора наиболее часто используются методы физической и химической сорбции или их сочетание [31, 32].

Физическая сорбция рецепторных молекул

Физическая сорбция — наиболее простой и быстрый способ закрепления биомолекул на поверхности электрода, осуществляемый путем выдерживания электрода в водном растворе биореагента определенной концентрации. Адгезия к металлической поверхности достигается за счет электростатических взаимодействий и образования водородных [33] или координационных связей между атомами металла электрода и, например, атомами серы, входящими в состав белков [34]. Такой способ иммобилизации обеспечивает сохранение активности белковых молекул [35—37], а также формирование слоя невысокой плотности [38]. При этом почти всегда остается то же число активных центров антител, хотя в некоторых случаях отмечают снижение функциональной активности из-за конформационных изменений молекул [39—41]. Количество сорбированного белка, а значит и чувствительность сенсора, определяется природой металла и свойствами белка, зависящими от pH, ионной силы раствора и температуры, а также от продолжительности экспонирования сенсора в растворе биореагентов. В работе [42] по-

казано, что рецепторное покрытие, полученное при инкубировании в течение четырех суток выдерживало до 20 измерительных циклов без снижения величины аналитического отклика.

Данный способ иммобилизации биореагента применяется достаточно часто для получения рецепторных покрытий на основе различных антител: козьих антител к рицину [43], антител к *Vibrio cholera* [36], к вирусу герпеса [44, 45] и рекомбинантных фрагментов специфических антител к вирусу иммунодефицита человека (HIV) [46, 47] и т.п. Количество иммобилизованных антител и клеток достаточно точно оценивается по разности частотных сдвигов модифицированного и чистого пьезокварцевого кристалла.

Основными недостатками метода физической сорбции является низкая стойкость формируемого покрытия, что сказывается на воспроизводимости результатов определения и сроке службы сенсора. Так как этот метод не обеспечивает высокой концентрации поверхностных функциональных групп, которая достигается при ковалентной иммобилизации, чувствительность биослоя невысока [36].

Путем физической сорбции часто формируют промежуточный слой, достаточно прочно связывающийся как с поверхностью электрода, так и молекулами иммунореагентов. Для получения белковой прослойки используются конканавалин А (лектин, выделяемый из растений) и белок А (полипептид из *Staphylococcus aureus*) [28, 29], образующий достаточно прочные комплексы с золотом в нейтральной среде [48]. Особенностью белка А является способность специфически взаимодействовать с молекулами иммуноглобулинов (особенно класса IgG), не затрагивая активных центров антител и способствуя сохранению их активности в иммобилизованном состоянии [37, 49]. Такой способ обеспечивает не только высокую чувствительность рецепторного слоя, но и его эластичность, что немаловажно для эффективной и стабильной работы пьезокварцевого иммуносенсора. Так, сенсоры для определения инсулина [50], некоторых вирусов и бактерий [51] с рецепторным покрытием, полученным на основе белка А, показали высокую чувствительность и стабильность работы даже спустя несколько месяцев с начала их эксплуатации.

При иммобилизации природных биополимеров, содержащих как гидрофильные, так и гидрофобные участки, учитывают необходимость закрепления на поверхности электродов соответствующих фрагментов молекулы. Использование веществ небелковой природы для получения рецепторного слоя расширяет круг иммунореагентов, которые могут применяться в

качестве распознающих элементов иммуносенсоров. Предложен способ формирования рецепторного слоя иммуносенсора на основе дифильных молекул липополисахаридов, выделенных из бактерий *Escherichia coli* [52] и *Yersinia enterocolitica* [53, 54]. Для определения в биологических жидкостях антител, образующихся в ответ на попадание микроба в организм высших животных и человека, особенно важно обеспечивать пространственную доступность углеводной части макромолекул липополисахаридов, а точнее О-специфических полисахаридов. Активация поверхности электродов липидами способствует направленной ориентации О-специфических полисахаридных цепей в сторону водного раствора, содержащего антитела (рис. 2а). Благодаря природной ковалентной связи между липидной и углеводной областями в молекуле липополисахарида исключается необходимость проведения дополнительных стадий кросс-связывания биомолекул с подложкой. При этом полисахаридные антигенные детерминанты (участок полисахаридной цепи, обеспечивающий специфическое связывание) остаются пространственно доступными для взаимодействия с активными центрами антител. При закреплении молекул липополисахарида на поверхности более гидрофильного модификатора (силоксан) возникает противоположная ориентация биомолекул (рис. 2б), что приводит к инаktivации части углеводных детерминант и, следовательно, к снижению эффективности иммунохимического взаимодействия иммобилизованных молекул со специфическими антителами.

Химическое закрепление рецепторных молекул

Методом химической сорбции получают насыщенные, плотные, трудно разрушаемые слои, устойчивые в жидких средах [55]. При ковалентной иммобилизации достигается более прочное закрепление биослоя на электроде сенсора, что снижает потери рецепторных молекул при длительном контакте с жидкостью, обеспечивает более высокую воспроизводимость аналитического сигнала и возможность многократного использования биослоя после его

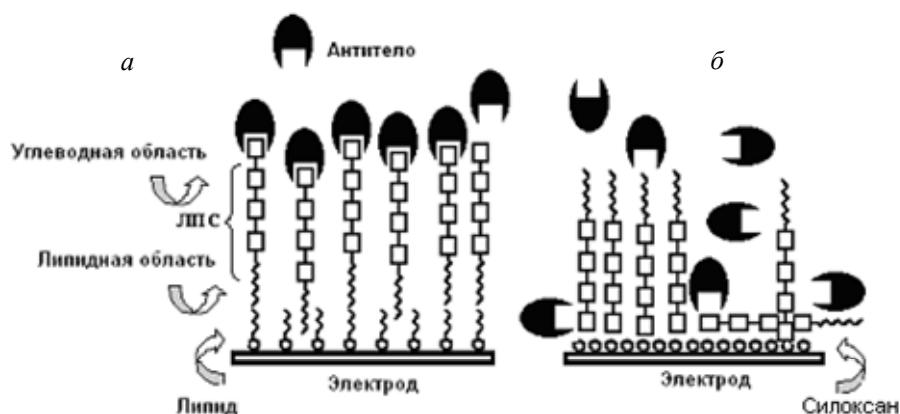


Рис. 2. Схема взаимодействия антител с липополисахаридами (ЛПС), иммобилизованными на гидрофобной подложке (а) и на гидрофильной подложке (б)

регенерации. Химическая сорбция способствует защите функциональной активности белков на длительное время (до двух лет). Однако в отдельных случаях возможно снижение количества активных центров антител при использовании жестко действующих химических реагентов [56].

Разновидностью метода химической сорбции является распространенный метод кросс-сшивки. Кросс-сшивку осуществляют с помощью различных гомо- и гетеробифункциональных реагентов (кросс-линкеров), например, гидразид- и сукцинимидсодержащих производных, но чаще всего применяется глутаровый альдегид, который легко вступает в реакцию с аминогруппами белков, образуя дополнительные метиленовые мостики в белковой молекуле.

Практически все методы химической иммобилизации осуществляются в несколько стадий (рис. 3). Поверхность электрода сенсора активируют нанесением прочной тонкой пленки (подложки), содержащей активные функциональные группы, необходимые для последующей иммобилизации белковых молекул.

Более высокая прочность связывания биомолекул достигается на матрице из полиэтиленамина [57, 58] или полиэтиленмина [57]. Привлекательны полимерные матрицы, полученные путем электрополимеризации [59] или методом тлеющего разряда [25], исключающие использование токсичных растворителей, например метанола. К полученной таким образом пленке белковые молекулы прикрепляют ковалентно, однако пока этот способ используется редко.

Наибольший интерес исследователей вызывает формирование подложки из самоорганизованных монослоев на основе кремнийорганических соединений, тиоловых производных, цистамина, цистимина для закрепления биомолекул. Получаемые таким образом наноструктурированные покрытия имеют ряд достоинств: минимальную массу, однородность, равномерное распределение и пространственную доступность функциональных групп для закрепления рецепторных молекул, высокую механическую прочность и химическую стабильность [60, 61].

Широко используемым приемом формирования подложки из самоорганизованных монослоев является силанизация [5, 62—66] с помощью γ -аминопропилтриэтоксисилана и γ -глицидоксипропилтриметоксисилана с активными amino- и алкоксигруппами, соот-

ветственно. Прикрепление антител к силоксановым пленкам, осуществляемое через аминогруппы или карбонильные группы бифункциональных кросс-линкеров [67], обеспечивает формирование плотных покрытий (74—220 нг/см²), сохраняющих высокий уровень специфического антигенного связывания (до 92%).

Другой распространенный подход к получению монослоя связан с использованием серосодержащих соединений (тиолы и дисульфиды), необратимо сорбирующихся на поверхности золота за счет координационных связей между атомами серы и золота. Наиболее изучены покрытия на основе алкантиолов. Поскольку монослои ориентируются и стабилизируются за счет ван-дер-ваальсовых сил между метиленовыми группами, увеличение длины цепи алкантиолов (свыше 10 метиленовых групп) приводит к более упорядоченным структурам монослоев [34].

Предложены эффективные способы иммобилизации гаптен-белковых конъюгатов с использованием для активации поверхности электрода (Au) силоксана и липоевой кислоты [68]. На активированной поверхности электрода происходит непосредственное ковалентное связывание биомолекулы с реакционными группами линкеров. Биорецепторные слои сенсоров, полученные этими способами, характеризуются высокой механической прочностью, устойчивостью к действию регенерирующих растворов и высокой биологической активностью иммобилизованных конъюгатов.

Эффективным представляется комбинирование различных способов прикрепления молекул к поверхности электродов пьезокварцевых гравиметрических сенсоров. Так, например, методом физической сорбции могут быть иммобилизованы как антитела, так и белковые подложки, к которым рецепторные молекулы иммуноглобулинов прикрепляют с использованием кросс-линкеров или специфических взаимодействий (авидин—биотин). Это открывает возможность целенаправленного выбора биораспознающих молекул, предназначенных для определения различных по природе аналитов [69].

Важным качеством иммуносенсоров является возможность регенерации биослоя после каждого акта определения. Так как иммунный комплекс стабилизируется электростатическими взаимодействиями, ван-дер-ваальсовыми силами, водородной связью, то повышение ионной силы регенерирующих растворов может вызвать конформационные изменения активного центра биомолекул. При этом аналит десорбируется с рецепторной поверхности, а у иммобилизованных биомолекул восстанавливается число центров связывания. Наиболее часто используют кислые или щелочные регенерирующие растворы: буферный раствор на основе 0,2 М глицина и соляной кислоты (pH = 2,5) [70]; 0,2 М раствор глицина [5]; 0,001 М HCl [31]; 0,1 М HCl [5]; 0,5 М H₂Cr₂O₇ [31]; 1 М HCOOH [62], 0,001—0,1 М NaOH [5]; растворы органических растворителей, в частности

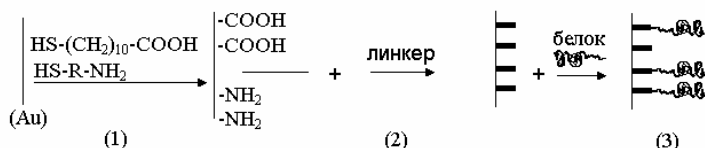


Рис. 3. Схема иммобилизации биомолекул на электроде путем химической сорбции.

Стадии иммобилизации: (1) — активация поверхности металла электрода (Au); (2) — модификация функциональных групп; (3) — иммобилизация белковой молекулы

30—50%-ный метанол [5], 6—8 М $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ [71] и другие денатурирующие реагенты. Имеются данные о применении 0,15—3 М раствора KSCN [64, 65], эффективность регенерирующего действия которого зависит от природы иммунореагентов. Регенерация этим раствором обеспечивает возможность использования биорецепторного слоя до 20 раз без снижения его активности.

Для полного очищения металлической поверхности электрода сенсора применяют более концентрированные растворы щелочей и кислот: 0,5—1,2 М NaOH (рН 11—13); 0,5—1,2 М HCl (рН 1—2), а также концентрированную соляную кислоту. После промывания и высушивания на пьезокварцевом резонаторе можно формировать новый биочувствительный слой.

Практическое применение пьезокварцевых биосенсоров для анализа жидких сред

Пьезокварцевые иммуносенсоры зарекомендовали себя как удобные инструменты для проведения биохимических и клинических обследований, сертификации пищевых продуктов и фармацевтических препаратов, мониторинга объектов окружающей среды. Они также используются для изучения кинетики биохимических взаимодействий и характеристики перекрестного связывания иммунореагентов [64, 72—74].

Перечень компонентов, определяемых с использованием пьезокварцевых сенсоров, разнообразен — это высоко- и низкомолекулярные соединения, соматические и бактериальные клетки, вирусы и фаги. В зависимости от массы аналитов применяют различные методики выполнения иммуноанализа [17, 75]. Определение крупных частиц (бактерии, вирусы, биологически активные макромолекулы — антитела, белковые антигены, нуклеиновые кислоты) обычно проводят путем прямого детектирования, осуществляемого в одну стадию. При пропускании через сенсор анализируемой пробы определяемые компоненты специфически связываются с иммобилизованными на поверхности электрода рецепторными молекулами, образуя иммунокомплекс, а остальные вещества уносятся с потоком раствора-носителя. Возрастание массы электрода за счет образованного иммунного комплекса приводит к уменьшению резонансной частоты сенсора пропорционально концентрации аналита в пробе (рис. 4). Такой анализ выполняется как в статическом, так и проточном режиме. Electrodes сенсора модифицируют антигенами (молекулы ДНК, бактериальные антигены, гаптен-белковые конъюгаты, клетки и др.) или моноклональными антителами, а также сыворотками, содержащими поликлональные антитела.

Для определения низкомолекулярных соединений — лекарственных препаратов, гормонов, алкалоидов, пестицидов, метаболитов, экотоксикантов, активаторов роста и других биологически активных веществ, как правило, используют конкурентный формат иммуноанализа [76] (рис. 5), поскольку при связывании низкомолекулярных веществ (гаптен) приращение

массы биочувствительного слоя незначительно. Для проведения анализа по конкурентной схеме на поверхности сенсора иммобилизуют гаптен-белковые конъюгаты на основе определяемого соединения. В анализируемую пробу, содержащую гаптен, вводят фиксированное количество специфических антител, которые могут связываться как с иммобилизованным, так и со свободным гаптеном. В этом случае чем ниже концентрация определяемого гаптена в пробе, тем большее количество антител связывается с иммобилизованным гаптеном и соответственно больше величина аналитического сигнала сенсора. По чувствительности конкурентный метод превосходит прямой [77, 78] и в настоящее время для определения низкомолекулярных веществ этот метод используется наиболее часто.

Анализ пищевых продуктов и объектов окружающей среды

Возрастание требований к качеству и безопасности продуктов питания вызвано поступлением на рынок опасных для здоровья продуктов, которые могут содержать токсичные соединения, в том числе антропогенного происхождения. Попадание загрязняющих веществ в окружающую среду со сточными водами промышленных и сельскохозяйственных предприятий, содержащих остатки ядохимикатов, удобрений, стимуляторов роста и других веществ, приводит к накоплению токсикантов в рыбных, овощных, мясных и молочных пищевых продуктах. Практика применения пьезоиммуносенсоров демонстрирует широкие возможности этих аналитических устройств для определения остаточных количеств поллютантов (табл. 1).

Как следует из литературных источников, многочисленную группу составляют пьезокварцевые сен-

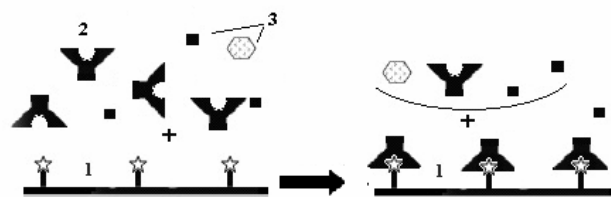


Рис. 4. Схема прямого определения антител:

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

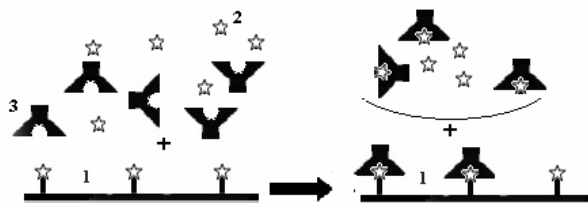


Рис. 5. Схема непрямого/конкурентного анализа:

1 — иммобилизованный антиген (гаптен), 2 — свободный антиген, 3 — антитело

соры, предназначенные для определения пестицидов. Методики определения пестицидов различаются по формату (прямое, конкурентное детектирование) и условиям проведения анализа (статический, проточно-инжекционный режимы). Так, детектирование хлорацетанилидных гербицидов (алахлор, ацетохлор, бутахлор) осуществляют по конкурентной схеме методом «окунуть и высушить» [80, 82]. Предел обнаружения алахлора и ацетохлора составляет 0,02 нг/мл, а бутахлора — 0,002 нг/мл, что позволяет использовать сенсоры для определения гербицидов на уровне ПДК и ниже в питьевых, поверхностных и подземных водах. Даже при использовании в качестве рецепторных молекул поликлональных антител возможно селективное определение гербицидов в сложных по составу пробах, так как перекрестные взаимодействия антител со структурными аналогами не превышают 4%. Анализом в проточном режиме можно измерять более высокие концентрации (нижняя граница определяемых концентраций, например, ацетохлора составляет 20 нг/мл [79]).

Наибольшее количество публикаций посвящено сенсорам для определения атразина и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Методики определения отличаются природой используемых рецепторных молекул и форматом выполнения анализа. Проведение иммуноанализа по прямому формату позволяет определять более низкие концентрации атразина (0,01 нг/мл) [62], что возможно связано с изменением вязкоэластичных свойств пограничных слоев жидкости при образовании иммунных комплексов.

Для формирования рецепторных покрытий полимеры с молекулярными отпечатками рассматриваются как альтернатива биореагентам [96, 97]. Синтетические имитаторы, заменяющие биомолекулы, характеризуются более высокой стабильностью и низкой стоимостью, чем привлекают возрастающее внимание исследователей. Однако в большинстве случаев биомиметические сенсоры показывают более низкую чувствительность по сравнению с иммуносенсорами. Например, предел обнаружения атразина и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на 3—4 порядка выше (100 и 22,1 нг/мл, соответственно) по сравнению с аналогичной величиной для иммуносенсоров [87].

Для определения в речной воде низкомолекулярных фосфорорганических токсикантов, являющихся ингибиторами холинэстеразы (параоксон, диизопропилфторофосфат, хлорпирифос, хлорфенвинфос), предложены энзимосенсоры. Анализ проводят по конкурентной схеме: в анализируемую пробу вводят холинэстеразу, а в качестве материала для рецепторного покрытия используют производное кокаина — бензоилэтионин-1,8-диамин-3,4-диоксиоктан. Предел обнаружения фосфорорганических пестицидов в речной воде составляет 0,02 нг/л [85]. Такой сенсор может быть также полезен для анализа мочи в судебно-медицинской экспертизе, поскольку отмечена корреляция концентрации токсикантов с продолжительностью воздействия фосфорорганических соединений на организм.

Широкое применение эмульгаторов, красителей и детергентов в производстве пищевых продуктов, косметических средств и полимерных упаковочных материалов приводит к загрязнению объектов окружающей среды и выпускаемой продукции эндокринными ядами (бисфенол А, нонилфенол, линейные алкилбензолсульфонаты, эфиры фталевой кислоты и др.). Предложены пьезокварцевые иммуносенсоры для определения в проточно-инжекционном режиме следовых концентраций нонилфенола и бисфенола А в водных растворах [88, 89]. Показано, что рецепторный слой может быть сформирован не только на основе гаптен-белковых конъюгатов, но и из молекул определяемого соединения (бисфенол А), которые закрепляют на поверхности подложки с помощью кросслинкеров при УФ-облучении [88]. Сенсоры позволяют в течение нескольких минут обнаружить в природных водах, косметических средствах и продуктах питания, хранящихся в упаковке из полимерных материалов, присутствие нонилфенола и бисфенола А на уровне 0,8 и 0,5 нг/мл, соответственно.

Предложен сенсор для проточного определения сульфаниламидов — противомикробных лекарственных веществ, применяемых для лечения животных и птиц, что приводит к их накоплению в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды. Разработанный пьезокварцевый биосенсор на основе сульфаметоксазол-белкового конъюгата характеризуется групповой специфичностью. Это обусловлено применением в качестве рецепторных молекул поликлональных антител, перекрестно реагирующих с сульфаметазиним, гемисукцинатом сульфаметазина, стрептоцидом, являющихся структурными аналогами сульфаметоксазола. Сенсор предназначен для определения достаточно низких концентраций сульфопрепаратов (0,15 нг/мл) в объектах окружающей среды (почва, речная вода) и в пищевых продуктах (молоко, куриное мясо, яйца) [2, 65, 98, 99].

Разработаны методики определения в водных растворах биотоксинов, продуцируемых водорослями. Например, для определения охадаевой кислоты (основной токсин водорослей) разработаны иммуносенсоры, чувствительность которых значительно меняется в зависимости от применяемых рецепторных молекул и способа получения распознающего слоя [90]. Так, сенсор с рецепторным покрытием на основе гаптен-белкового конъюгата, ковалентно закрепленного на подложке из полиэтиленimina, позволяет в конкурентном формате анализа выявлять токсин с пределом обнаружения 1900 нг/мл. Использование в качестве распознающих молекул антител, закрепленных с помощью гидрогеля на основе бычьего сывороточного альбумина, делает возможным изменение формата иммуноанализа на прямое детектирование и снижение более чем в 500 раз предела обнаружения низкомолекулярного токсина.

Актуальным в настоящее время является вопрос о выявлении генетически модифицированных организмов. Пьезосенсоры на основе ДНК или олиго-

Примеры определения токсикантов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров

Определяемый компонент	Рецепторный реагент/матрица	Объект анализа	Предел обнаружения, линейный интервал определяемых содержаний, нг/мл	Литература
Ацетохлор	Гаптен-белковый конъюгат/4-аминотиофенол или сукцинимидилпропионат	Поверхностная и питьевая воды	20	[79]
	Гаптен-белковый конъюгат/силоксан	Почва, молоко, яблочный сок	0,02	[80]
Алахлор	Гаптен-белковый конъюгат/силоксан	Колбасные изделия	0,02	[81]
Бутахлор	Гаптен-белковый конъюгат/силоксан	Рисовая крупа	0,002	[82]
Атразин	ПМО*	Водные среды	100	[83]
	Конкурентный способ	Пищевые продукты и объекты окружающей среды	0,025	[27, 84]
	Прямое определение		0,01	[62]
Параоксон, диизопропилфторофосфат, хлорпирифос, хлорфенвинфос	Производное кокаина / 11-меркаптомоноундекановая кислота	Речная вода	0,02	[85]
2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота	Гаптен-белковый конъюгат/аминотиофенол	Пищевые продукты и объекты окружающей среды	0,24—0,27	[86]
	ПМО*	Водные среды	22,1	[87]
Бисфенол А	Гаптен-белковый конъюгат/силоксан	Поверхностные воды, упаковочная тара для пищевых продуктов	0,5	[88]
Нонилфенол	Гаптен-белковый конъюгат/силоксан	Поверхностные воды	0,8	[89]
Гексахлорбензол	ПМО*	Водные среды	$2,85 \cdot 10^{-3}$	[90]
Полиароматические углеводороды	Антитела/силоксан	Водные среды	0,01 мкмоль/л (10^{-5} моль/л)	[91, 92]
Сульфаметоксазол	Гаптен-белковый конъюгат/силоксан	Пищевые продукты, объекты окружающей среды, лекарственные препараты	1—50; 0,15	[65, 93]
T-2 микотоксин	Антитела/полиаллиламингидрохлорид или белок А (электростатическая адсорбция)	Водные растворы	0,1—150	[94]
Окадаевая кислота	Гаптен-белковый конъюгат/полиэтиленимин (кросс-сшивка); гидрогель на основе антитела и БСА**	Объекты окружающей среды	1900	[95]

* ПМО — полимеры с молекулярными отпечатками, синтетический аналог иммунореагентов.

** БСА — бычий сывороточный альбумин.

нуклеотидов, позволяющие обнаруживать комплементарные участки молекул ДНК или РНК при гибридизации, могут быть успешно использованы для этой цели, что продемонстрировано в работах по оценке качества пищевых продуктов [100, 101]. Полученные данные свидетельствуют о способности сенсора к чувствительному и специфичному обнаружению генетически модифицированных организмов в результате проведения гибридизации между геномным фрагментом (одноцепочечная молекула ДНК), иммобилизованным на поверхности сенсора и отвечающим за проявления мутаций, и ДНК, извлеченной из исследуемого материала.

Клиническая диагностика

Экспрессность измерений с использованием пьезокварцевых биосенсоров явилась причиной пристального интереса к ним со стороны специалистов по клинической лабораторной диагностике. Эти аналитические системы дают возможность не только интенсифицировать работу при выполнении большого количества анализов, но и сократить время, необходимое для оказания врачебной помощи. Высокая чувствительность пьезокварцевых сенсоров позволяет проводить раннюю диагностику, когда симптомы патологии проявляются только на молекулярном уровне. Кроме того, важно, что появляется возможность наблюдения биохимической реакции и ее отдельных стадий в режиме реального времени. С помощью пьезоиммуносенсоров возможно выявление широкого круга клинически важных аналитов, которые служат специфическими маркерами многих соматических и инфекционных заболеваний (табл. 2).

Многочисленные публикации посвящены использованию пьезоиммуносенсоров для определения белковых молекул, например антител различных классов, в сыворотке крови, высокий или нарастающий титр которых свидетельствует об активной инфекции в организме и имеет наибольшее диагностическое и прогностическое значение (например, при кандидозе — наиболее распространенной грибковой инфекции). В зависимости от природы вторичных антител к иммуноглобулинам, используемых в методике анализа, чувствительность определений может различаться на порядок.

Для проведения эффективного лечения аллергических заболеваний необходимо осуществлять анализ сыворотки крови больных на содержание иммуноглобулинов Е (IgE). Для этой цели разработан сенсор с рецепторным покрытием на основе вторичных антител к человеческому IgE, позволяющий определять суммарное содержание иммуноглобулинов в статических условиях. [17, 31]. Для выявления специфичных антител к конкретным аллергенам, иммобилизованным в качестве рецепторного слоя, проводится сэндвич-анализ. При этом вторичные антитела, вводимые после связывания рецепторного слоя с антителами исследуемой сыворотки (IgG, IgE и др.), обнаруживаются при добавлении в пробу вторичных антител к IgE, что

позволяет определять в сыворотке крови присутствие иммуноглобулинов Е, специфичных к каждому аллергену. Линейная зависимость аналитического сигнала сенсора от содержания IgE наблюдается в интервале $(0,15—17,5) \cdot 10^3$ нг/мл.

Предложен иммуносенсор для прямого определения антител к ДНК, появляющихся в крови при развитии аутоиммунных патологических процессов (системная красная волчанка, хронический гломерулонефрит, ревматоидный артрит и др.). Сенсор с иммобилизованными одноцепочечными молекулами ДНК используют как детектор в проточно-инжекционном анализе, что обеспечивает определение в сыворотке крови антител к ДНК на уровне 0,1—25 мкг/мл [18].

Увеличение концентрации α -фетопротеина (ракового эмбрионального антигена) или ферритина в сыворотке крови человека может быть следствием развивающихся онкологических процессов в организме. Разработанный сенсор для обнаружения ферритина, имеющий высокую чувствительность, обеспечивает определение этого вещества в узком интервале концентраций, что не позволяет пока использовать его для анализа крови.

Применяемые в настоящее время методы практической клинической диагностики для определения мочевых белков, являющихся маркерами почечной патологии (нефропатического диабета), длительны и в большинстве случаев требуют введения радиоактивной метки. Мультисенсорная система на основе линейки пьезокварцевых биосенсоров делает возможным одновременное определение микроколичеств микроальбумина, α_1 - и β_2 -микроглобулина и IgG в моче [119].

Покрываются сенсора на основе полимеров с молекулярными отпечатками (сополимер акриламида и акриламидофенилборной кислоты) обеспечивают определение кофакторов НАД(Ф)⁺/НАДФ-Н в водных растворах по приращению массы за счет ассоциации и поглощения воды из раствора [120]. Сенсоры с покрытиями на основе фенилтриметоксисилана и метилтриметоксисилана демонстрируют возможность высокочувствительного определения в жидких средах аминокислот L-триптофана и L-гистидина, минимальная определяемая концентрация $2,5 \cdot 10^{-8}$ М и 4,5 мМ, соответственно [116, 117]. К сожалению, большинство исследований выполнено на модельных водных растворах. Авторы не приводят результатов анализа реальных биологических жидкостей (кровь, моча, слюна, лимфа и др.), что затрудняет оценку достоинств и недостатков сенсоров.

Большинство описанных иммуносенсоров предназначено для проведения микробиологических исследований. Они оказались более удобными по сравнению с практикуемыми в настоящее время технологиями, требующими для выполнения анализа нескольких дней. Созданы пьезоиммуносенсоры для определения наиболее распространенных безвредных бактерий, а также патогенных вирусов (гепатита, герпеса, иммунодефицита человека и др.). Подробная информация

Примеры использования пьезокварцевых иммуносенсоров для клинической диагностики

Определяемый компонент	Рецепторный реагент/матрица	Объект анализа	Предел обнаружения, линейный интервал определяемых содержаний	Литература
Вирус гепатита А, Б	Антитело/белок А	Жидкие среды	10^5 частиц/мл	[102, 103]
IgE	Вторичные антитела к человеческим IgE/липовая кислота (химическая сорбция)	Жидкие среды	$(0,15—17,5) \cdot 10^3$ нг/мл	[17, 31]
	Аффинное прикрепление к аптамеру на основе одноцепочечной ДНК	То же	0,05 нМ/мл	[104]
Антитела к ДНК	Денатурированные ДНК/силоксан, глутаровый альдегид	Сыворотка крови	$(0,1—25) \cdot 10^3$ нг/мл	[18]
Антитела к <i>Y. enterocolitica</i>	Липополисахариды/липидная подложка	То же	1,3 мкг/мл	[53, 105, 106]
α -Фето-протеин	Антитела/цистиминный монослой	Жидкие среды	1,5 нМ/л	[107]
	IgG/цистамин (физическая сорбция или хемосорбция)	Клиническая диагностика рака, сыворотка крови	$(0,1—100) \cdot 10^3$ нг/л 15,3—600,0 нг/мл	[108]
Раковый эмбриональный антиген	Антитела/тиольные соединения	Сыворотка крови	1,56—50 нг/мл	[109]
Кокаин	Антитела/белок G	Жидкие среды	33 мкМ/л	[110]
	Гаптен/меркаптоундекановая кислота	—"	34 нг/л	[111]
Котинин	Антитела/силоксан	То же	0,1 мкМ/л	[18, 112]
Биотинилированная ДНК	Стрептавидин-пероксидазный комплекс	Диагностика генных мутаций	0,1 нМ	[113]
Стрептавидин	Биотин-БСА (регистрация с усилением золотыми наночастицами)	Жидкие среды	50 нг/мл, $1—10 \cdot 10^3$ нг/мл	[114]
Тромбин	Аптамеры (биотин-авидин-технология)	Клиническая диагностика генных мутаций	1—100 нМ	[115]
L-триптофан	Полимеры с молекулярными отпечатками	Жидкие среды	$8,8 \cdot 10^{-3}$ мМ	[116]
L-гистидин	То же	То же	$2,5 \cdot 10^{-8}$ М $5,0 \cdot 10^{-8}—1,0 \cdot 10^{-4}$ М	[117]
Тромбин	Антитромбин аптамеры/аминосилоксан	—	0—50,8 нМ 11 нМ	[118]

представлена в обзорах [17, 32, 75]. Для идентификации вируса гепатита В в жидких средах предложены ДНК-сенсоры [121, 122], по чувствительности не уступающие иммуносенсорам.

Биосенсоры на основе ДНК и антител к кишечной палочке *E. coli* могут использоваться для анализа канализационных стоков, являющихся основным источником передаваемой через воду инфекции, для оценки качества пищевых продуктов, а также в клинической диагностике. Для определения микроорганизмов (вирус табачной мозаики [123] и отдельных

клеток) предложены сенсоры на основе полимеров с молекулярными отпечатками. В этом случае формирование рецепторного покрытия осуществляется методом литографии [124].

Проводятся интенсивные исследовательские работы, направленные на внедрение в практику иммуносенсоров для выявления патогенных бактерий человека и животных (табл. 3). Сенсор для определения туберкулезной палочки (*M. tuberculosis*) в водных растворах и слюне (предел обнаружения 10^5 клеток/мл) делает возможным проведение абсолютно безболезненной

Таблица 3

Примеры определения микроорганизмов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических жидкостях с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров

Определяемый компонент	Рецепторный реагент/матрица	Объект анализа	Предел обнаружения, линейный интервал определяемых содержаний	Литература
<i>Salmonella typhimurium</i>	Антитела/полиэтиленимин (иммобилизация с помощью бифункционального реагента)	Пищевые продукты	$1,2 \cdot 10^9$ клеток/мл	[125]
<i>E. coli</i>	Антитела/силоксан (ковалентная иммобилизация)	Пищевые продукты	$3 \cdot 10^4$ — $3 \cdot 10^7$ клеток/мл	[126]
<i>M. tuberculosis</i>	Антитела/белок А	Слюна	10^5 — 10^8 клеток/мл	[127]
Вирус табачной мозаики	Полимеры с молекулярными отпечатками	Речная вода	100—1000 нг/мл	[123]
X-вирус картофеля	Антитела/силоксан (хемосорбция)	Сок картофеля	$4 \cdot 10^{-2}$ — $6 \cdot 10^3$ нг/мл	[63]
Противочумные бактериофаги	Антитела/силоксан (ковалентная иммобилизация)	Водные растворы	$0,05 \cdot 10^5$ фагов/мл (0,2—1) 10^5 фагов/мл	[128, 129]
Бактерии <i>Y. enterocolitica</i>	Антитела/полисахарид (ковалентная иммобилизация)	Питьевая вода, продукты питания, биологические объекты	$0,02 \cdot 10^4$ клеток/мл	[130]

экспресс-диагностики туберкулезной инфекции, а также санитарно-гигиенического контроля. Пьезокварцевые иммуносенсоры успешно применяются в ветеринарии для идентификации возбудителей инфекции у животных [42, 131], птицы [132], а также при оценке качества сельскохозяйственной продукции [17, 131].

В настоящее время в биохимических, иммунологических и генетических исследованиях широко используются бактериофаги — паразиты микробов, с помощью которых проводят расшифровку тонкой структуры генов, идентификацию и ускоренное обнаружение возбудителей бактериальных инфекций. Предложен сенсор на основе специфичных антител к противочумным бактериофагам для их прямого определения в интервале концентраций $(0,2—1) \cdot 10^5$ фагов/мл [128, 129].

Для экспрессного определения патогенных для человека микробов, в частности, бактерии *Y. enterocolitica* — возбудителя инфекционного заболевания иерсиниоза, которое передается через инфицированные продукты питания, хранящиеся в холодильнике и употребляемые без термической обработки (свежие овощи и фрукты), предложен сенсор, позволяющий оценить качество питьевой воды, продуктов питания и различных видов биологического материала [130].

Таким образом, пьезокварцевые биосенсоры позволяют определять в сложных по составу образцах (пищевые продукты, объекты окружающей среды и лекарственные препараты) следовые концентрации различных по природе низкомолекулярных биологически активных веществ на уровне ПДК и ниже.

Заключение

Аналитические возможности пьезокварцевых биосенсоров не исчерпываются приведенными примерами. Широкое внедрение в аналитическую практику относительно дешевых анализаторов жидкости на основе пьезокварцевых биосенсоров позволит существенно повысить качество анализа, выявлять и определять биологические соединения в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, биологических жидкостях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 06-09-96339 и № 03-06-32226).

ЛИТЕРАТУРА

1. Rickert J., Hayward G.L., Cavic-Vlasak B.A., Thompson M., Gopel W. In: Sensors Update 5. Weinheim: Wiley-VCH, 1999, p. 105.
2. Thompson M., Arthur C.L., Dhaliwal G.K. Anal. Chem., 1986, v. 58, p. 1206.
3. Skladal P. Biosens. Bioelectron., 1999, v. 14, p. 257.
4. Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Будников Г.К. Ж. аналит. химии, 2001, т. 56, № 10, с. 1015—1031.
5. Skladal P., Horacek J., Malina M. Kluwer Academic Publishers. Eds. D.P. Nikolelis, U.J. Krull, J. Wang, M. Mascini. Netherlands, 1998, p. 145.
6. Tombelli S., Minunni M., Santucci A., Spiriti M.M., Mascini M. Talanta, 2006, v. 68, № 3, p. 806—812.
7. Minunni M., Mascini M., Guilbault G.G., Hock B. Anal. Lett., 1995, v. 28, p. 749.
8. Proske D., Blank M., Buhmann R. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, v. 69, p. 367—374.

9. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Альшиов Р.С. Тр. VIII Региональной конф. «Проблемы химии и химической технологии», Воронеж 21—22 сентября 2000 г, с. 205—207.
10. Guilbault G.G. Anal. Chem., 1983, v. 55, p. 1682—1684.
11. Guilbault G.G., Ngeh-Ngwainbi J. In: Biosensors International Workshop 1987. Ed. R.D. Schmid. GBF Monographs, GBF Braunschweig-Stocheim., 1987, v. 10, p. 187.
12. Ngeh-Ngwainbi J., Foley P.H., Kuan S.S., Guilbault G.G. J. Am. Chem. Soc., 1986, v. 108, p. 5444.
13. Guilbault G.G., Jordan J.M. Anal. Chem., 1988, v. 19, p. 1.
14. Luong J., Guilbault G. In: Biosensors: Principles and Applications. Ed. P. Coulet. New York: Marcel Dekker, 1991.
15. Suleiman A.A., Guilbault G. Analyst, 1994, v. 119, p. 2279.
16. Bunde R.L., Jarvi E.J., Rosentreter J.J. Talanta, 1998, v. 46, p. 1223.
17. Su X.D., Chew F.T., Li S.F.Y. Biosens. Bioelectron., 2000, v. 15, p. 629.
18. Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н., Еремин С.А. Вестн. Моск. университета. Сер. Химия, 2002, т. 43, № 6, с. 399—403.
19. Mannelli I., Minunni M., Tombelli S., Mascini M. Biosens. Bioelectron., 2003, v. 18, p. 129—140.
20. Fukusho S., Furusawa H., Okahata Y. Nucl. Acids Symp. Series, № 44, p. 187—188.
21. Tombelli S., Minunni M., Mascini M. Biomol. Eng., 2007, v. 24, p. 191—200.
22. Shons A., Dorman F., Najarian J. J. Biomed. Mater. Res., 1972, v. 6, p. 565.
23. McCallum J.J. Analyst, 1989, v. 114, p. 1173.
24. Su X., Dai C., Zhan J., O'Shea S.J. Biosens. Bioelectron., 2002, v. 17, p. 111.
25. Saber R., Mutlu S., Piskin E. Ibid., 2002, v. 17, p. 727.
26. Muratsugu M., Ohta F., Miya Y., Hosokawa T., Kurasawa S., Kato N., Ikeda H. Anal. Chem., 1993, v. 65, p. 2933.
27. Minunni M., Skladal P., Mascini M. Anal. Lett., 1994, v. 27, p. 1475.
28. Babacan S., Privarnik P., Letcher S., Rand A.G. Biosens. Bioelectron., 2000, v. 15, p. 616.
29. Barnes C., D'Silva C., Jones J.P., Levis T.J. Sens. Actuators, 1991, v. B3, p. 295.
30. Chen L., He X., Hu X., Hu H. Analyst, 1999, v. 12, p. 1787.
31. Su X.D., Chew F.T., Li S.F.Y. Anal. Sci., 2002, v. 16, p. 107.
32. Skladal P. J. Braz. Chem., 2003, v. 14, № 4, p. 491—502.
33. Horisberger M., Vauthey M. Histochemistry, 1984, v. 80, p. 13.
34. Wink T., Zuilen S.Y., Bult A., Bennekom W.P. Analyst, 1977, v. 122, p. 43R.
35. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Струкова М.В., Перетягина О.И., Еремин С.А. Тез. докл. всерос. симп., Москва, 2001, с. 66.
36. Carter R.M., Mekalanos J.J., Jacobs M.B., Lubrano G.J., Guilbault G.G. J. Immunol. Meth., 1995, v. 187, p. 121.
37. Kennedy J.F., Cabral J.M.S. In: Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects. Ed. W.H. Scouten. New York: Wiley, 1983, p. 253.
38. Ulbrich R., Golbik R., Schellenberger A. Biotechnol. Bioeng., 1991, v. 37, p. 280.
39. Morrissey B.W., Han C.C. J. Colloid Interface Sci., 1978, v. 65, p. 423.
40. Davies J., Dawkes A.C., Haymes A.G., Roberts C.J., Sunderland R.F., Wilkins M.J., Davies C.M., Tandler S.J.B., Jackson D.E., Edwards J.C. J. Immunol. Meth., 1994, v. 167, p. 263.
41. Bulter J.E., Navarro P., Sun J. Immunol. Invest., 1997, v. 26, p. 39.
42. Uttenhaller E., Kosslinger C., Drost S. Anal. chim. acta., 1998, v. 362, p. 91.
43. Carter R.M., Jacobs M.B., Lubrano G.J., Guilbault G.G. Anal. Lett., 1995, v. 28, p. 1379.
44. Konig B., Gratzel M. Ibid., 1993, v. 26, p. 1567.
45. Zupan S., Filipic B., Babic M. Acta Pharm., 1992, v. 42, p. 361.
46. Kosslinger C., Hanck S., Abel T., Uttenhaller E., Drost S. Chimia, 1998, v. 52, № 7/8, p. 318.
47. Aberl F., Wolf H., Koeslinger C., Drost S., Woias P., Koch S. Sens. Actuators., 1994, v. 18B, p. 271.
48. Davis K., Leary T. Anal. Chem., 1989, v. 61, p. 1227.
49. Ren X., Kobatake E., Aizawa M. Analyst, 2000, v. 125, p. 669.
50. Saha S., Raje M., Suri C.R. Biotechnol. Lett., 2002, v. 24, p. 711.
51. Babacan S., Pivarnik P., Letcher S., Rand A. J. Food Sci., 2002, v. 67, p. 314.
52. Chang H.-C., Yang C.-C., Yeh T.-M. Anal. chim. acta., 1997, v. 340, p. 49.
53. Патент РФ № 2287585, Бюл. изобр. № 32, 2006.
54. Калмыкова, Е.Н., Дергунова Е.С., Горикова Р.П. и др. Сорбционные и хроматографические процессы, 2006, т. 6, № 3, с. 415—422.
55. Leckband D., Langer R. Biotechnol. Bioeng., 1991, v. 37, p. 227.
56. Barie N., Rapp M. Biosens. Bioelectron., 2001, v. 16, p. 979.
57. Tang A.H.J., Pravda M., Guilbault G.G., Piletsky S., Turner A.P.F. Anal. chim. acta, 2002, v. 471, p. 33.
58. Zang C., Feng G., Gao Z. Biosens. Bioelectron., 1997, v. 12, p. 1219.
59. Si S.H., Ren F.L., Cheng W., Yao S.Z. Fresenius J. Anal. Chem., 1997, v. 357, p. 1101.
60. Park L.-S., Kim N. Biosens. Bioelectron., 2000, v. 15, p. 167.
61. Zhang S.L., Peng T.Z., Yang C.F. J. Electroanal. Chem., 2002, v. 522, p. 152.
62. Pribyl J., Hepel M., Halamek J., Skladal P. Sens. Actuators., 2003, v. 91B, p. 333.
63. Фадеев А.Ю., Ельцов А.А., Алешин Ю.К., Малышенко С.И., Лисичкин Г.В. Ж. физ. химии, 1994, т. 68, № 11, с. 2071.
64. Калмыкова Е.Н., Мелихова Е.В., Дергунова Е.С., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Сорбционные и хроматографические процессы, 2004, т. 4, № 5, с. 597—605.
65. Калмыкова Е.Н., Мелихова Е.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Антибиотики и химиотерапия, 2004, т. 49, № 1, с. 8-13.
66. Мелихова Е.В., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. и др. Сорбционные и хроматографические процессы, 2006, т. 6, № 1, с. 99—107.
67. Sriver-Like L.C., Donner B., Edelstein R., Breslin K., Bhatia S.K., Ligler F.S. Biosens. Bioelectron., 1997, v. 12, p. 1101.
68. Bartlett P.N., Brace K., Calvo E.J., Etchenique R. J. Mater. Chem., 2000, v. 10, p. 149.
69. Калмыкова Е.Н., Гарбузова А.В., Шапканова О.Ю., Зубова Н.Ю., Ермолаева Т.Н. Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация, 2007, № 1, с. 47—52.
70. Dupont-Filliard A., Guillerez S., Bigan G. Talanta, 2001, v. 55, p. 981.
71. Prusak-Sochazewski E., Loung J.H.T., Guilbault G.G. Enzyme Microb. Technol., 1990, v. 12, p. 173.
72. Pohanka M., Pavlis O., Skladal P. Sensors, 2007, v. 7, p. 341.
73. Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Изв. вузов. Химия и химтехнол., 2005, т. 48, вып. 12, с. 76—80.
74. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевые сенсоры: Аналитические возможности и перспективы. Липецк: ЛПГУ, 2007, 190 с.
75. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н. Успехи химии, 2006, т. 75, № 5, с. 445—459.
76. Bizet K., Gabrielli C., Perrot H. Analysis, 1999, v. 27, p. 609.
77. Steegborn C., Skladal P. Biosens. Bioelectron., 1997, v. 12, p. 19.
78. Guilbault G.G., Hock B., Schmid R. Biosens. Bioelectron., 1992, v. 7, p. 411.

79. Lebedev M. Yu., Eremin S. A., Skladal P. *Anal. Lett.*, 2004, v. 36, p. 2443—2457.
80. Нартова Ю.В., Еремин С.А. Ермолаева Т.Н. Сорбционные и хроматографические процессы, 2006, т. 6, вып. 5, с. 764—772.
81. Нартова Ю.В., Еремин С.А. Ермолаева Т.Н. Российская школа-конференция молодых ученых: «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии», 28 октября—3 ноября 2006г. Пушкино: ИБФМ РАН, 2006 г., с.68—70.
82. Нартова Ю.В. Мат. межд. конф. молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2007», Химия, т.1. Москва, 2007, с. 39.
83. Luo C., Liu M., Mo Y., Qu J., Feng Y. *Anal. chim. acta*, 2001, v. 428, p. 143—148.
84. Prusak-Sochazewski E., Luong J. *Anal. Lett.*, 1990, v. 23, p. 183.
85. Halamek J., Pribyl J., Makower A., Skladal P., Scheller F.W. *Anal. and Bioanal. Chem.*, 2005, v. 382, № 8, p. 1904—1911.
86. Horacek J., Skladal P. *Anal. chim. acta.*, 1997, v. 347, p. 43.
87. Liang C., Peng H., Nie L., Yao S. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, v. 367, p. 551—555.
88. Дергунова Е.С., Ермолаева Т.Н. Всерос. студ. научно-техн. школа-конф. «Инженерные науки — защите окружающей среды». Сб. тр. Тула, 2006, с. 136—140.
89. Ермолаева Т.Н., Дергунова Е.С., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А. *Ж. аналит. химии*, 2006, т. 61, № 6, с. 660—665.
90. Das K., Penelle J., Rotello V.M. *Langmuir*, 2003, v. 19, № 9, p. 3921—3925.
91. Liu M., Li Q.X., Rechnitz G.A. *Anal. chim. acta*, 1999, v. 387, p. 29.
92. Fahnrich K.A., Pravda M., Guilbault G. *Anal. Lett.*, 2002, v. 35, p. 1269.
93. Мелихова Е.В., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. *Ж. аналит. химии*, 2006, т. 61, № 7, с. 744—750.
94. Naboka A.V., Tsargorodskaya A., Holloway A., Starodub N.F., Gajster O. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, v. 22, p. 885—890.
95. Alice X., Tang J., Pravda M., Guilbault G. G., Piletsky S. *Anal. chim. acta*, 2002, v. 471, p. 33—40.
96. Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. *Успехи химии*, 2006, т. 75, № 10, с. 998—1017.
97. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Кузнецова А.Ю., Золотов Ю.А. *Ж. аналит. химии*, 2004, т. 59, № 9, с. 902—912.
98. Калмыкова Е.Н., Мелихова Е.В., Дергунова Е.С., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Сорбционные и хроматографические процессы, 2005, № 2, с. 14—20.
99. Патент РФ № 2287820, Бюл. изобр. № 6, 2006.
100. Minunni M., Tombelli S., Mariotti E., Mascini M. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, v. 369, p. 589.
101. Minunni M., Tombelli S., Pratesi S., Mascini M., Piatti P., Bogani P., Buiatti M. *Anal. Lett.*, 2001, v. 34, p. 825.
102. Konig B., Gratzel M. *Anal. chim. acta.*, 1995, v. 309, p. 19.
103. Zhou X.D., Liu L.J., Hu M., Wang L.L., Hu J.M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, v. 27, p. 341.
104. Liss M., Petersen B., Wolf H., Prohaska E. *Anal. Chem.*, 2000, v. 74, p. 4488.
105. Патент РФ № 2288472, Бюл. изобр. № 33, 2006.
106. Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н., Зубова Н.Ю. Сб. науч. тр. преподавателей и сотрудников ЛГТУ «Технические науки — региону», Липецк, 2006, с. 39—46.
107. Chou S.-F., Hsu W.L., Hwang J.M., Chen C.Y. *Anal. chim. acta*, 2002, v. 453, p. 181.
108. Zhang B., Fu W., Mao Q., Yao C., Chen M., Xu S., Yu F. *China Academ. J.: Medicine*, 2006, v. 23, p. 708—712.
109. Ding Y., Liu J., Wang H., Shen G., Yu R. *Biomaterials.*, 2007, v. 28, p. 2147—2154.
110. Suri C.R., Raje M., Mishra G.C. *Biosens. Bioelectron.*, 1994, v. 9, p. 325.
111. Halamek J., Makower A., Skladal P., Scheller F.W. *Ibid.*, 2002, v. 17, p. 1045.
112. Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. *Изв. вузов. Химия и химич. технол.*, 2005, т. 48, вып. 12, с. 92—95.
113. Feng K., Li J., Jiang J.-H., Shen G.-L., Yu R.-Q. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, v. 22, p. 1651—1657.
114. Kim N. H., Baek T. J., Park H. G., Seong G. H. *Anal. Sci.*, 2007, v. 23, p. 177—181.
115. Hianik T., Ostatná V., Sonlajmerova M., Grman I. *Bioelectrochem.*, 2007, v. 70, p. 127—133.
116. Liu F., Liu X., Ng S.-C., Chan H. S.-O. *Sens. Actuators*, 2006, v. 113B, p. 234—240.
117. Zhang Z., Liao H., Li H., Nie L., Yao S. *Anal. Biochem.*, 2005, v. 336, p. 108—116.
118. Bang G. S., Cho S., Kim B.-G. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, v. 21, p. 863—870.
119. Luo Y., Chen M., Wen Q., Zhao M., Zhang B., Li X., Wang F., Huang Q., Yao C., Jiang T., Cai G., Fu W. *Clin Chem.*, 2006, v. 52, p. 2273—2280.
120. Pogorelov S.P., Zayats M., Bourenko T., Kharitonov A.B., Katz E., Lioubashevski O., Willner I. *Anal. Chem.*, 2003, v. 75, № 3, p. 509—517.
121. Zhang B., Jiang T., Fu W., Chen M., Liu M., Yu L., Cai G., Chen Q., Wu R., Wang F. *J. Nanosci. and Nanotechnol.*, 2005, v. 5, p. 1266—1272.
122. Zhou X., Liu L., Hu M., Wang L., Hu J. *Pharm Biomed Anal.*, 2002, v. 1-2, p. 341—345.
123. Dickert F., Hayden O., Bindeus R., Mann K.-J., Blaas D., Waigmann E. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, v. 378, № 8, p. 1929—1934.
124. Dickert F., Tortschanoff M., Weber K., Zenkel M. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1998, v. 361, № 1, p. 21—24.
125. Babacan S., Pivarnik P., Letcher S., Rand A.G. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, v. 15, p. 615—621.
126. Adanyl N., Varadi M., Kim N., Szendro I. *Curr. Appli. Phys.*, 2006, v. 6, p. 279—286.
127. He F., Zhang L. *Anal. Sci.*, 2002, v. 18, p. 397—401.
128. Шашканова О.Ю., Дергунова Е.С., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Сорбционные и хроматографические процессы, 2007, т. 7, вып. 4, с. 548—555.
129. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Дергунова Е.С. Сб. науч. тр. преподавателей и сотрудников ЛГТУ, Липецк, 2003, с. 59—61.
130. Калмыкова Е.Н., Гарбузова А.В., Шашканова О.Ю., Зубова Н.Ю., Ермолаева Т.Н. *Изв. вузов. Химия и химич. технол.*, 2007, т. 50, вып. 9, с. 10—15.
131. Su X.D., Sam F.Y.Li, Wei Liu, Kwang J. *Analyst*, 2000, v. 125, p. 725.
132. Konig B., Gratzel M. *Anal. chim. acta*, 1993, v. 26, p. 2313.