

УДК 543.866

**К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ АКТИВАЦИИ  
ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ  
В СОСТАВЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО СЕНСОРА  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ  
К *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *CANDIDA ALBICANS***

Э.П. Медянцева, Н.В. Шелкоплясова, Г.Р. Сафина, О.Н. Базарнова,  
Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева, Г.К. Будников

**Аннотация**

На примере определения специфических антител к *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* с помощью нового иммуноферментного сенсора рассмотрено действие факторов, влияющих на величину аналитического сигнала. Показана возможность использования в качестве меток антигенов (антител) ферментов, относящихся к разным классам. На основании экспериментальных данных предложен механизм процесса активации каталитического действия иммобилизованной холинэстеразы в твердофазном иммуноферментном анализе. Иммуносенсор позволяет определять до  $5 \cdot 10^{-12}$  антител против *Staphylococcus aureus* и  $3 \cdot 10^{-12}$  мг/мл антител против *Candida albicans* в диапазоне концентраций  $5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-11}$  и  $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-12}$  мг/мл соответственно.

**Ключевые слова:** антитела, антигены, иммуноферментный сенсор, метка, холинэстераза.

---

**Введение**

Биосенсорные устройства в последние годы все чаще используются в различных областях медицины, биохимических исследованиях, при контроле пищевых продуктов благодаря простоте выполнения с их помощью определений, возможности автоматизации и миниатюризации, высокой чувствительности и специфичности определений. Весьма перспективными в этом плане оказались амперометрические сенсоры, основанные на сочетании иммунохимических принципов взаимодействия, биокаталитических и электрохимических реакций. Комбинация каталитических свойств фермента и уникальной специфичности иммунологических реакций позволяет проводить чувствительное и селективное определение самых различных соединений [1–3].

Присутствие даже незначительного количества возбудителей инфекционных и аллергических заболеваний в организме может представлять серьезную угрозу для жизнедеятельности человека, а несвоевременная диагностика приводит к тяжелым последствиям. Ранняя и точная диагностика заболеваний является поэтому одной из наиболее актуальных проблем клинической медицины сегодня. Важным этапом при выявлении аллергических состояний служит оп-

ределение наличия в биологических жидкостях антител (аллергенспецифических) к микроорганизмам.

Традиционные методы, используемые для определения бактерий, длительны, трудоемки, недостаточно чувствительны [4]. В связи с этим возрастает интерес к разработке новых, экспрессных, надежных и чувствительных вариантов анализа. Отмечается рост интереса к созданию иммуно- и иммуноферментных сенсоров с применением электродных систем, изготовленных по screen-printed (печатной) технологии [5, 6]. Совместная иммобилизация различных агентов на поверхности таких электродов способствует повышению экспрессности анализов и позволяет определять несколько возбудителей из одной пробы.

*Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) и некоторые другие условно патогенные бактерии считаются обитателями нормальной микрофлоры, но при определенных условиях способны вызывать заболевания от незначительных кожных инфекций до тяжелых поражений внутренних органов [7]. Бактериологический анализ, наряду с данным возбудителем, довольно часто выявляет присутствие грибкового возбудителя *Candida albicans* [4, 8]. Разные по своей природе микроорганизмы способны вызывать сходные по симптоматике заболевания, а долгая циркуляция их в организме приводит к выработке соответствующих антител (Ат) к ним. Поэтому представляло интерес разработать способ количественного определения при совместном присутствии аллергенспецифических Ат к *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* с помощью новых амперометрических иммуноферментных сенсоров на основе платиновых планарных электродов.

В то же время выяснение механизма отклика, являющегося сочетанием разных по природе процессов, в таких сложных системах, как рассматриваемые в данной работе, позволяет осознанно подходить к выбору условий регистрации аналитического сигнала и дает возможность выявить условия для получения максимального аналитического сигнала.

В настоящей работе сделана попытка объяснить наблюдающиеся процессы, лежащие в основе функционирования предлагаемого многоэлектродного иммуноферментного сенсора для определения при совместном присутствии Ат против *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Представлены аналитические возможности их количественного определения в сыворотке крови.

## 1. Экспериментальная часть

**1.1. Аппаратура и оборудование.** Основой разрабатываемых иммуноферментных сенсоров (ИФС) для определения иммунореагентов служила система, состоящая из четырех рабочих электродных поверхностей, объединенных на единой керамической подложке (производство фирмы BVT Technologies, Брно, Чехия). Материалом поверхности рабочего электрода, на которую иммобилизуются фермент и компоненты иммунологической реакции, является платиносодержащая паста. Электрод сравнения изготавливается из серебра. Объем рабочей ячейки системы составлял 120 мкл. Все измерения с использованием этих электродов проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора “МЕВ” с компьютеризированным управлением. Прибор предназначен для работы с различными печатными электродами, как с одной рабочей

поверхностью, так и с несколькими (от 4 до 8) и позволяет производить измерения токов в области потенциалов от  $-1$  до  $+1$  В.

Спектрофотометрические измерения проводили при температуре  $25$  °С,  $\lambda$  280 и 260 нм с помощью прибора Spectrometer Lambda EZ-210 (Perkin Elmer, Германия).

**1.2. Реактивы.** В качестве одного из субстратов использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ) (ICN Biomedicals Inc., США), раствор которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более трех часов. Применяли бутирилхолинэстеразу, активностью 29 АЕ/мг, изготовленную НПО “Биомед” (Россия, г. Пермь), щелочную форфатазу активностью 1000 АЕ/мг (Sigma, Германия), L-цистеиндисульфидгидразу получали из растительной ткани огурца [9]. В качестве субстратов применяли 1-нафтил фосфата моносодиевую соль марки «ч.д.а.» и L-цистеин «х.ч.» (Япония, Диа М).

В работе использовали антигены (Аг) *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и соответствующие антитела (Ат) против них, полученные в лаборатории по разработке бактериальных аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Методика получения включает в себя механическое разрушение микробных клеток (дезинтеграцию), специфическую экстракцию с помощью боратного буферного раствора с рН 7.2–7.4, отделение неразрушившихся компонентов клеточной стенки, фильтрацию, стандартизацию по белковому азоту. Аг нетоксичны, не содержат низкомолекулярных компонентов и используются для получения коммерческих препаратов из бактериальных клеток. Поликлональные антитела получены методом ступенчатой иммунизации. Концентрации водных растворов Ат и Аг были определены спектрофотометрически.

Для *Staphylococcus aureus* (Аг) исходная концентрация составляла 0.995 мг/мл, концентрация Ат – 1.1 мг/мл. Для *Candida albicans* начальная концентрация Аг – 0.908 мг/мл и Ат – 1 мг/мл.

Использовали бычий сывороточный альбумин марки “Sigma” (США), 25%-ный раствор глутарового альдегида фирмы “ICN Biomedicals, Inc.” (США). Для изготовления буферных растворов применяли гидрофосфат и дигидрофосфат натрия марок «ч» и «чда» (ЗАО «Лаверна», Россия).

**1.3. Получение иммуноферментных сенсоров.** Для получения биочувствительной части иммуноферментных сенсоров проводили совместную иммобилизацию соответствующего фермента с иммунореагентами в различных концентрациях на поверхность рабочего электрода. В качестве матричного компонента для процедуры иммобилизации биореагентов использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

На основе БСА готовили смесь, содержащую 10 мкл раствора фермента с определенной концентрацией и каталитической активностью, 5 мкл раствора Ат (Ат), 11.5 мкл раствора БСА ( $C = 50$  мг/мл), 30 мкл фосфатного буфера (50 мМ, рН 7.0), 100 мкл дистиллированной воды. Сшивающий реагент (1%-ный раствор глутарового альдегида) вносили в последнюю очередь и после перемешивания на поверхность рабочих электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом иммуносенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке

Петри при температуре 4 °С. На следующий день сенсоры промывали водой, высушивали на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

**1.4. Электрохимические измерения.** При определении аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* регистрацию аналитического сигнала проводили при заданном потенциале +0.5 В, измеряемом относительно псевдоиодидсеребряного электрода сравнения, который образуется при условии использования БТХИ в качестве субстрата холинэстеразы (ХЭ). Регистрацию токов окисления осуществляли в потенциостатическом режиме. Установлено, что для достижения постоянного значения тока окисления необходимо 2–3 мин, в дальнейшем значения токов остаются постоянными.

## 2. Результаты и их обсуждение

Ранее было показано, что возможно определение как Аг *Staphylococcus aureus*, так и Аг *Candida albicans* с помощью амперометрических одноэлектродных иммуносенсоров [6, 10]. В этом случае в состав биочувствительной части иммуносенсоров, независимо от используемого первичного преобразователя, входили иммобилизованные Ат против соответствующих бактериальных Аг. Отмечено, что возможен и обратный процесс – определение отдельных Ат [11]. Исходя из этого, можно предположить, что при определенных условиях возможно определение Ат против *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* из одного раствора с помощью многоэлектродных иммуносенсоров. Для этого в первую очередь необходимо было подобрать соотношения концентраций метящего фермента (например ХЭ) и антигенов (Аг) для их совместной иммобилизации на поверхности платиновых планарных электродов с целью получения биочувствительной части, выбрать рабочие условия функционирования предлагаемого иммуносенсора, то есть подобрать рН буферного раствора, интервал рабочих концентраций Ат и Аг, а также оценить влияние иммунных комплексов на каталитическую активность иммобилизованных ферментов.

**2.1. Выбор рН буферного раствора.** Для каждого фермента существует определенная область оптимальных значений рН, при которых он проявляет максимальную каталитическую активность. График зависимости каталитической активности ферментов от рН раствора обычно имеет колоколообразную форму. Значение рН, соответствующее максимальной каталитической активности фермента, чаще всего не совпадает со значением рН, характерным для внутриклеточного окружения этого фермента. При его закреплении в полимерной матрице оптимум рН может смещаться как в более кислую, так и более щелочную область, что существенно зависит от способа иммобилизации и природы носителя [12]. В работе проводилась оценка удельной каталитической активности иммобилизованной холинэстеразы ( $A$ , мкмоль/мин·см<sup>2</sup>), входящей в состав биочувствительной части ИФС, в зависимости от значений рН фосфатного буферного раствора (рис. 1). Установлено, что наибольшую каталитическую активность иммобилизованная холинэстераза проявляет в фосфатном буферном растворе с рН  $7.5 \pm 0.5$ , поэтому данное значение рН использовали для дальнейших исследований.

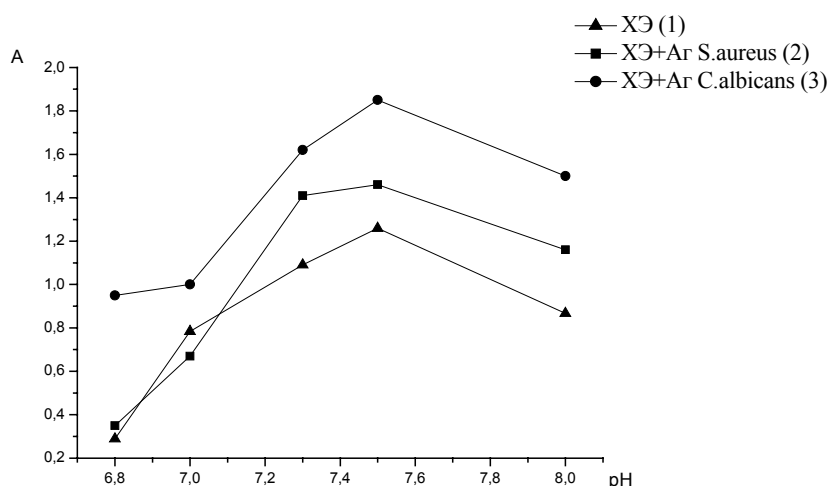


Рис. 1. Зависимость величины удельной каталитической активности холинэстеразы (А, мкмоль/мин·см<sup>2</sup>) в отсутствии иммунореагентов (1) и при ее совместной иммобилизации с антигенами *Staphylococcus aureus* (1 : 20) (2), и *Candida albicans* (1 : 100) (3) от pH фосфатного буферного раствора.

**2.2. Выбор концентрации фермента и антигенов.** Для получения биочувствительной части ИФС с наилучшими характеристиками были подобраны концентрации фермента (ХЭ) и соответствующих Аг. Проведенные ранее на кафедре аналитической химии исследования показали, что высокие концентрации иммунореагентов уменьшают каталитическую активность фермента, что может быть связано с конформационными затруднениями при подходе субстрата к его поверхности [13]. Было установлено, что хорошо выраженный аналитический сигнал наблюдается в интервале соотношений ХЭ : Аг от 30 : 1 до 300 : 1.

Установлено, что иммобилизация Аг при указанных концентрациях (0.05 и 0.009 мг/мл) не оказывает ингибирующего действия на фермент. Это следует из сопоставления каталитической активности иммобилизованной ХЭ в отсутствие соиммобилизованных Аг и при их совместном присутствии (табл. 1).

Совместное включение антигенов и ХЭ в биочувствительную часть сенсора незначительно сказывается на активности соиммобилизованной ХЭ, поэтому эти концентрации иммунореагентов и были использованы в дальнейшей работе.

**2.3. Природа формирования аналитического сигнала.** Принцип формирования аналитического сигнала предлагаемого ИФС, отражающего степень протекания биоспецифических взаимодействий в изучаемых системах, основывается на сочетании иммунологической, биокаталитической и электрохимической реакций.

Холинэстераза катализирует реакцию гидролиза БТХИ (уравнение (1)), который является для нее специфическим субстратом, что позволяет изучать свойства как нативной, так и иммобилизованной ХЭ:

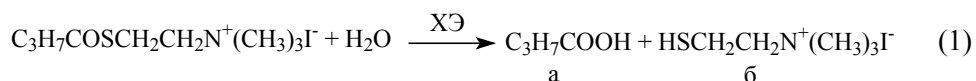


Табл. 1

Величина каталитической активности ИХЭ при совместной иммобилизации с Аг *Staphylococcus aureus* или *Candida albicans* ( $n = 5$ ;  $P = 0.95$ )

Соиммобилизованные Аг	Удельная каталитическая активность ИХЭ, мкмоль/мин·см <sup>2</sup>	
	в отсутствии Аг	при наличии Аг
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2
<i>Candida albicans</i>	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.5

Продукт реакции (б) – тиол при определенных условиях электрохимически активен. На печатных платиносодержащих электродах он подвергается процессу окисления:



Это позволяет использовать ХЭ как метку при иммунохимических определениях, поскольку величина аналитического сигнала зависит от количества образующегося тиола, а значит, от активности иммобилизованного фермента. Введение Ат в исследуемый раствор в присутствии иммобилизованных Аг приводит к увеличению аналитического сигнала. Можно предположить, что иммунный комплекс, образующийся на поверхности биочувствительной части ИФС, является эффектором иммобилизованной ХЭ, увеличивая ее активность. В определенных интервалах концентраций Ат,  $5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-11}$  для *Staphylococcus aureus*,  $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-12}$  мг/мл для *Candida albicans*, эффект активации носил линейный характер.

Следует отметить, что ранее при разработке ИФС для определения Аг *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus* также наблюдали аналогичное явление [6, 10, 14]. Было высказано предположение о том, что наблюдающееся увеличение аналитического сигнала в присутствие Аг по сравнению с контрольным опытом в их отсутствие связано с активирующим эффектом образующегося иммунного комплекса. Причиной же активирующего действия иммунного комплекса на активность иммобилизованной ХЭ является, по видимому, преобладающее значение электростатического взаимодействия молекул субстрата БТХИ с компонентами биоспецифического взаимодействия по сравнению с другими эффектами в данной системе. Это может быть связано с тем, что в условиях эксперимента (рН 7.5) Аг *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*, а также иммуноглобулины имеют общий отрицательный заряд ( $pI \approx 4$ ), перекрывающий общие заряды фермента и Ат (Аг) при образовании иммунного комплекса, а субстрат ХЭ – БТХИ имеет положительно заряженную катионную головку (см. уравнения (1) и (2)). Это способствует привлечению дополнительного количества субстрата непосредственно к рабочей поверхности ИФС. Кроме того, электростатические взаимодействия относятся к числу необходимых для функционирования холинэстеразы при образовании фермент-субстратного комплекса и дальнейшего биокаталитического взаимодействия [15]. Можно ожидать, что, по-видимому, в условиях функционирования предлагаемых в рамках этой работы ИФС сохраняются те же закономерности формирования аналитического сигнала, что и в рассматриваемом выше случае [6, 10, 14].

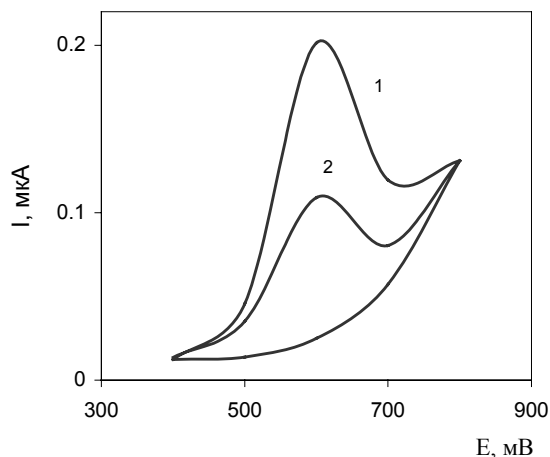
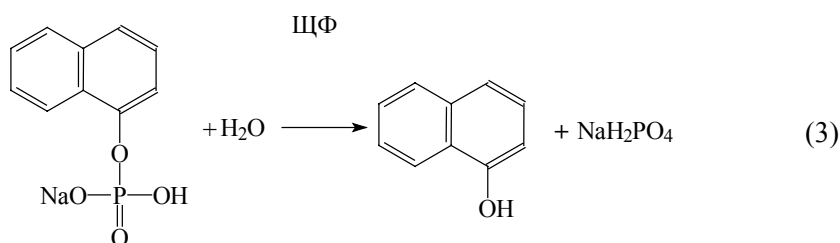


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления 1-нафтола на платиновом электроде на фоне буферного раствора (рН 7.6) в присутствии иммобилизованной ЩФ (кривая 1) ( $C_s = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л); в присутствии иммобилизованных ЩФ и Аг *Staphylococcus aureus* и Ат к *Staphylococcus aureus* (1 : 20) ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  мг/мл) (кривая 2).

Для доказательства высказанного предположения использовали в качестве метки не только ХЭ и систему ХЭ – БТХИ, но и другие фермент-субстратные системы, такие как щелочная фосфатаза – 1-нафтил фосфат, L-цистеиндисульфгидраза – L-цистеин.

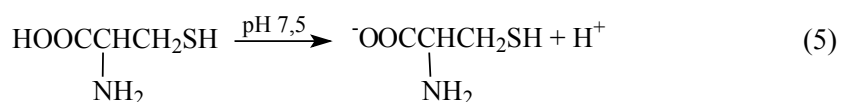
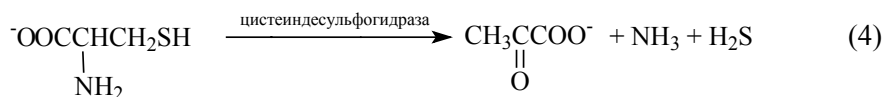
Известно, что под действием щелочной фосфатазы (ЩФ) 1-нафтил фосфат натрия подвергается биокаталитическому гидролизу с образованием продукта – 1-нафтола по схеме [16]:



Продукт ферментативной реакции электрохимически активен [17], подвергается процессу окисления на платиносодержащих электродах, что находит отражение в соответствующем виде вольтамперограмм, представленных на рис. 2. Пик окисления 1-нафтил фосфата наблюдается при потенциале +0.6 В (кривые 1 и 2). Для создания биочувствительной части сенсора проводили совместную иммобилизацию щелочной фосфатазы и Аг *Staphylococcus aureus* в разведении 1 : 20 на поверхность одноэлектродной печатной системы. Введение Ат *Staphylococcus aureus* в изучаемый раствор вызывает уменьшение величины аналитического сигнала по сравнению с контрольным опытом в отсутствие Ат (рис. 2, кривая 2) по мере уменьшения концентрации вводимого раствора антител. Возможно, это связано с тем, что образующийся на поверхности биочувствительной части ИФС иммунный комплекс затрудняет подход молекул суб-

страта к активному центру фермента. Из сопоставления величин удельной каталитической активности фермента в отсутствие соиммобилизованных Аг против *Staphylococcus aureus* и в их присутствии было установлено, что включение в состав биочувствительной части сенсора Аг совместно со ЩФ незначительно влияет на ее каталитическую активность. Кроме того, согласно литературным данным, электростатические взаимодействия в системе ЩФ – субстрат не играют такого большого значения, как в системе ХЭ – БТХИ [15, 16].

Подтверждением предполагаемого механизма формирования сигнала может служить использование еще одной детектирующей системы фермент-субстрат. L-цистеиндесульфгидраза – фермент класса лиаз (КФ 4.4.1.1). В состав его активного центра входит пиридоксальфосфат. Фермент катализирует распад L-цистеина с образованием пировиноградной кислоты, аммиака и сероводорода (уравнение (4)). Это один из ферментов класса лиаз, содержащийся, согласно литературным данным [9] в растительном материале листьев огурца. В условиях эксперимента (рН 7.5) L-цистеин, субстрат цистеиндесульфгидразы (ЦГД), может иметь общий отрицательный заряд (рК<sub>α</sub>-соон 1.71, рК<sub>α</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 10.78, рК<sub>R</sub> 8.33) (уравнение (5)):



При потенциале +0.65 В происходит окисление L-цистеина до дисульфида, аналогично уравнению (2). Регистрировали величину тока окисления L-цистеина в отсутствие в растворе специфических Аг против *Staphylococcus aureus* или *Candida albicans* и в их присутствии при образовании комплексов Аг – Ат. Наблюдали уменьшение величины аналитического сигнала по сравнению с холостым опытом, что может быть равновероятно связано как со стерическими препятствиями подхода субстрата к активному центру фермента, так и с блокированием активного центра фермента в силу кулоновских взаимодействий одноименно заряженных молекул субстрата и иммунных комплексов на поверхности биослоя.

Использование в составе ИФС в качестве метки соиммобилизованной L-цистеиндесульфгидразы, иммунореагентов и наблюдаемые при этом эффекты выявили возможность влияния на суммарный процесс электростатического взаимодействия на поверхности биочувствительной части.

Все это указывает на правомерность высказанных предположений о механизме наблюдаемых активационных процессов при использовании ХЭ в качестве метки в составе ИФС. Следует отметить, что использование процессов увеличения каталитической активности ферментов в условиях твердофазного иммуоферментного анализа при определении микроколичеств определяемых иммуокомпонентов всегда более выгодно по сравнению с процессами ингибирования, так как позволяет получить максимально возможный аналитический сигнал в этих условиях.



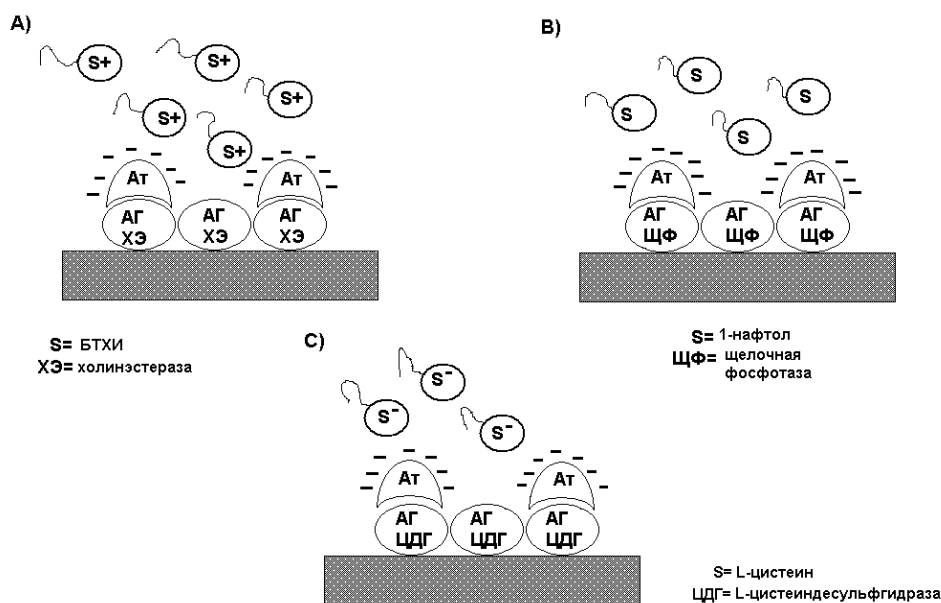


Рис. 3. Схема формирования аналитического сигнала ИФС при использовании биочувствительной части с совместно иммобилизованными ферментами и антигенами *Staphylococcus aureus* или *Candida albicans*. Фермент-субстратные системы: А) Холинэстераза – БТХИ; Б) Щелочная фосфатаза – 1 нафтил фосфат; В) L-цистеиндесульфгидраза – L-цистеин

Наблюдаемые процессы при формировании аналитического сигнала представлены на рис. 3.

**2.4. Использование разработанного амперометрического иммуноферментного сенсора для определения антител к *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* в образцах сывороток крови.** Бактериологический анализ, который традиционно используют для определения рассматриваемых микроорганизмов, достаточно длителен и занимает от 7 до 10 дней, кроме того, однозначность его интерпретации зависит от соблюдения ряда условий и квалификации специалиста [4]. На основании его данных можно выявить состав общей микрофлоры, однако многие микроорганизмы входят в состав нормальной микрофлоры организма большинства здоровых людей. Заболевание же обычно обусловлено не просто наличием возбудителей, а их размножением в большом количестве, что наблюдается при снижении общего и местного иммунитета. Применение разработанного ИФС и использование портативного оборудования (например, многоцелевого детектора “МЕВ”) позволяет значительно ускорить процедуру определения патогенов.

Предложена методика определения Ат против *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* из одного раствора при их совместном присутствии с помощью разработанного ИФС.

Известно, что обработка поликлональной антисыворотки при температуре 56 °С в течение 30 мин вызывает инактивацию иммуноглобулина Е (IgE), не влияя при этом на свойства других классов иммуноглобулинов. В настоящей

Табл. 2

Результаты определения специфического IgE в сыворотках крови пациентов ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

№	Данные бактериологического анализа	Определения с помощью ИФС		
		Многоканальный ИФС на основе планарного электрода		Стационарный ртутно-пленочный электрод для определения <i>Candida albicans</i> (КНИИЭМ)**
		$C_{AT}$ , мг/мл	Sr	
1	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	$(2.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-10}$ $(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-10}$	0.07 0.08	$2.3 \cdot 10^{-10}$
2	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-10}$ $(9.5 \pm 0.6) \cdot 10^{-6}$	0.05 0.06	$3.1 \cdot 10^{-9}$
3	—*	$(9.6 \pm 0.5) \cdot 10^{-9}$ $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$	0.06 0.09	$2.4 \cdot 10^{-8}$
4	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	$(5.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-8}$ $(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$	0.07 0.05	$4.9 \cdot 10^{-7}$
5	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	$(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-4}$ $(7.4 \pm 0.6) \cdot 10^{-11}$	0.06 0.08	—

\*Данные отсутствуют.

— отрицательный результат.

\*\*Результаты анализа получены сотрудниками Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии.

работе концентрацию аллергенспецифического IgE определяли как разность содержания количеств общего содержания иммуноглобулинов и иммуноглобулина G (Ig G), соответственно до и после тепловой обработки сывороток крови.

Апробация разработанного амперометрического ИФС для определения Ат против *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* из одного раствора проведена на сыворотках крови пациентов, страдающих аллергическими заболеваниями.

Результаты определений представлены в табл. 2.

Полученные данные сопоставлены с результатами бактериологического анализа и результатами иммуоферментного анализа на наличие в анализируемых пробах Ат против *Candida albicans*. Тяжелые формы заболевания характеризуются более высокими концентрациями антител в сыворотке крови по сравнению с более легкой формой. В случае, когда возбудитель (*Candida albicans*) локализован на поверхности кожных покровов, и не является патогенным, наблюдаются более низкие концентрации Ат в сыворотке (см., например, строку 3 табл. 2).

Таким образом, с использованием предлагаемого ИФС возможно чувствительное одновременное определение аллергенспецифических Ат к возбудителям различной природы (как бактериальным, так и фунгальным), что может облегчить проведение своевременной диагностики и выявление ведущей роли конкретного возбудителя.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-03-00479а).

### Summary

*E.P. Medyantseva, N.V. Shelkoplyasova, G.R. Safina, O.G. Bazarnova, N.I. Glushko, E.V. Khaldeeva, H.C. Budnikov.* Aspects of the Mechanism of Catalytic Activity of Immobilized Cholinesterase As a Part of Enzyme Immunosensor for Detection Allergenspecific Antibodies for *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

The new enzyme immunosensor for the quantitative identification of specific antibodies to the pathogens *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was developed. The influence of experiment conditions on the level of analytical signal was studied. The possibility of using different enzyme classes as labels to antigens antibodies was also demonstrated. Basing on the experimental data, the mechanism of activation as well as catalytic activity of immobilized cholinesterase were offered.

The immunosensor works in the concentration range of  $5 \cdot 10^{-4}$  –  $1 \cdot 10^{-11}$  and  $5 \cdot 10^{-4}$  –  $5 \cdot 10^{-12}$  mg/ml with a detection limit of  $5 \cdot 10^{-12}$ ,  $3 \cdot 10^{-12}$  mg/ml of specific IgE to *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* respectively.

**Key words:** antibodies, antigens, enzyme immunosensor, label, cholinesterase.

### Литература

1. Barcelo D. Biosensors for environmental monitoring: Monitoring in real environment // Anal. Chim. Acta. – 2002. – V. 456, No 1. – P. 1–8.
2. Marazuela M.D., Morenobondi M.C. Filber-optic Biosensors – an overview // Anal. and Bioanal. Chem. – 2002. – V. 372, No 5–6. – P. 664–682.
3. Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria // Biosensors & Bioelectronics. – 1999. – V. 14. – P. 599–624.
4. Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поддеев. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 1200 с.
5. Diaz-Gonzalez M., Gonzalez-Garcia M.B., Costa-Garcia A. Immunosensor for *Mycobacterium tuberculosis* on screen-printed carbon electrodes // Biosensors & Bioelectron. – 2004. – V. 20, No 10. – P. 2035–2043.
6. Сафина Г.Р., Медянцева Э.П., Фомина О.Г., Глушко Н.И., Вершинин А.А., Будников Г.К. Амперометрический иммуноферментный сенсор на основе платиновых планарных электродов для определения бактериального антигена *Staphylococcus aureus* // Сенсор. – 2004. – № 1. – С. 14–20.
7. Вельтищев Ю.Е., Комаров Ф. И., Навашин С.М. Справочник практического врача: в 2 т. – М.: Медицина, 1992. – Т. 2. – 336 с.
8. Poulain D., Howood V., Vernes A. Antigenic variability of *Candida albicans* // CRC Critical Reviews in Microbiology. – 1983. – V.12, No 3. – P. 223–267.
9. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. – С. 52–55.
10. Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Будников Г.К., Глушко Н.И. Определение антигена *Candida albicans* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // Вопр. мед. химии. – 1998. – Т. 44, № 2. – С. 172–178.
11. Safina G.P. Medyantseva E.P., Fomina O.G., Bazarnova O.N., Shelkoplyasova N.V., Glushko N.I., Budnikov H.C. Amperometric enzyme immunosensors for the determination of allergenspecific antibodies to the bacterial and fungal pathogens in biological liquids // Proc. Intern. Conf. “Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology”. – Tomsk, Russia, 2006. – V. 2. – P. 325–327.
12. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можяев В.В., Хмельницкий Ю.Л. Имобилизованные ферменты. – М.: Высш. шк., 1987. – 149 с.

13. Сафина Г.Р., Медянцева Э.П., Фомина О.Г., Глушко Н.И., Будников Г.К. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для диагностики некоторых инфекционных заболеваний // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 6. – С. 616–623.
14. Сафина Г.Р., Медянцева Э.П., Базарнова О.Н., Глушко Н.И., Будников Г.К. Определение бактериальных антигенов с помощью амперометрического многоканального иммуноферментного сенсора // Журн. аналит. химии. – 2006. – Т. 61, № 9. – С. 985–991.
15. Абдувахобов А.А., Михайлов С.С., Щербак И.Г. Антиферментное действие и детоксикация фосфорорганических ингибиторов холинэстераз. – Ташкент: Изд-во ФАН Узбекской ССР, 1989. – 184 с.
16. Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1984. – 216 с.
17. Коллинз У.П. Новые методы иммуноанализа. – М.: Мир, 1991. – 280 с.

Поступила в редакцию  
12.07.07

---

**Медянцева Эльвина Павловна** – доктор химических наук, профессор отдела аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: [Elvina.Medyantseva@ksu.ru](mailto:Elvina.Medyantseva@ksu.ru)

**Шелкоплясова Наталья Витальевна** – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

**Сафина Гульнара Рустамовна** – инженер отдела аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: [gulnara207@hotmail.com](mailto:gulnara207@hotmail.com)

**Базарнова Ольга Николаевна** – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

**Глушко Надежда Ивановна** – старший научный сотрудник лаборатории по разработке бактериальных аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

**Халдеева Елена Владимировна** – заведующий лабораторией по разработке бактериальных аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

E-mail: [E\\_Khaldeeva@mail.ru](mailto:E_Khaldeeva@mail.ru)

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор, заведующий отдела аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: [Herman.Budnikov@ksu.ru](mailto:Herman.Budnikov@ksu.ru)