

УДК: 577.112.087:577.150.87:577.352.52 57:66:5773

ІММОБІЛІЗАЦІЯ АНТИГЕНУ РЕТРОВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ПОВЕРХНІ ІМУННОГО БІОСЕНСОРА

*Л. В. Пирогова
М. Ф. Стародуб*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: lyudmilasy@ukr.net

Проаналізовано ефективність іммобілізації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби на поверхні перетворювача, вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами і похідними декстрану) для створення функціонально стабільних уніфікованих чутливих елементів оптичного імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу. Показано, що використання поліелектролітів поліаліламіну гідрохлориду і полістиренсульфонату для модифікації поверхні перетворювача біосенсора є найбільш доцільним, дешевим і простим під час проведення скринінгових досліджень. Змінні пластинки, що їх використовують як перетворювач, можуть бути підготовлені завчасно і використані в разі потреби.

Ключові слова: велика рогата худоба, вірусний лейкоз, діагностика, імунобіосенсорний аналіз, поверхневий плазмонний резонанс, додекантіол, поліелектроліти, декстран.

Експресний контроль за розповсюдженням ретровірусної інфекції серед людей та тварин — важлива світова проблема. Як відомо, ретровіруси є збудниками набутого імунодефіциту в людей, що кваліфіковано як захворювання на СНІД; вони, зокрема, є також збудниками вірусного лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ), вірусних хвороб риб, наприклад карциноми в щуки, тощо. Основним заходом для подолання захворювань, зумовлених ретровірусною інфекцією, є своєчасна діагностика їх. Хворих тварин вилучають з гурту та знищують. Загальноприйнятим засобом виявлення лейкозу ВРХ є традиційний імуноферментний аналіз, відомий як ELISA-метод. Для цього використовують, як правило, проби крові із шийної вени. Однак цей метод є довготривалим (аналіз триває близько 6 год), високоартістичним (вартість одного аналізу — близько 5 доларів США), досить складним, вимагає високої професійної підготовки виконавців та спеціального обладнання і реагентів (різних кон'югат, хімічних компонентів). В Україні застосовують дешевший, але менш чутливий і ще більш рутинний метод — реакцію імунодифузії (РІД). Ефективне оздоровлен-

ня стада потребує проводити його обстеження принаймні через кожні 10 днів у разі виявлення в ньому хворих тварин. Існуючими методами це неможливо здійснити через досить значну вартість аналізу і необхідність частого взяття проб крові. Ці проблеми успішно вирішуються із застосуванням запропонованого нами імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [1, 2]. Такий біосенсор може забезпечити прямий (без використання додаткових реагентів), експресний (здійснюваний протягом 3–5 хвилин), дешевий (вартістю менше 1 долара США) аналіз і навіть без взяття крові, а використовуючи лише краплину молока.

У попередніх дослідженнях була показана ефективність імунобіосенсора на основі ППР для реєстрації специфічної взаємодії антиген–антитіло, а також доведена можливість його використання для експресного визначення рівня антитіл, індукованих вірусом лейкозу (ВЛ) великої рогатої худоби, у крові тварин [3]. Для цього на поверхню перетворювача іммобілізували антиген ВЛ, отриманий від науково-виробничого ТОВ «Лейкопол» (м. Полтава). Іммобіліза-

ція антигену на поверхні забезпечувала селективне зв'язування специфічних антитіл із сироватки крові тварин. Виявилось, що результати аналізу істотно залежать від того, яким чином підготовлено шар золота на скляній поверхні, у який спосіб цю поверхню попередньо обробляли та який стан іммобілізованого біологічного матеріалу на поверхні трансдюсера. Нанесення на поверхню золота різних покриттів дозволяє збільшити чутливість біосенсора. Зокрема, модифікація сенсорної поверхні додекантіолом збільшує її в 1,3 раза [4]. Окрім того, у разі іммобілізації біологічних молекул звичайною фізичною адсорбцією на чистій поверхні золота або ж попередньо обробленій додекантіолом чи поліелектролітами [4, 5] досить значна частина їх може бути блокована внаслідок контакту активних центрів (наприклад, антигензв'язувальних сайтів) з поверхнею. Аби уникнути цього недоліку, використовують різні підходи, серед яких найпоширенішими є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки Ленгмюр-Блоджет різного складу [6] або попередня іммобілізація на поверхні білка А із *Staphylococcus aureus* [5] та лектинів [7, 8], що мають спорідненість до F_c-фрагмента IgG або ж до його карбогідратного компонента [9].

У наших дослідженнях особливу увагу приділяли саме оптимізації умов іммобілізації селективного біологічного матеріалу. В цій статті наведено експериментальні дані щодо порівняльного використання поліелектролітів, тіолів та похідних декстрану для іммобілізації антигену ВЛ з метою забезпечення ефективності процесу та функціональної стабільності підготовленої поверхні трансдюсера.

Матеріали і методи

Вимірювальний пристрій і принцип його роботи детально розглянуто раніше [1, 2]. Перетворювач імунного біосенсора у вигляді попередньо хромованої (3–5 нм шару Cr) скляної пластинки з напиленням шаром золота товщиною 45 нм поєднується з призмою оптичного приладу за допомогою імерсійної рідини (поліфенілового ефіру) з коефіцієнтом заломлення 1,6.

Антиген вірусу лейкозу отримано від науково-виробничого ТОВ «Лейкопол» (м. Полтава). В експерименті використовували розчин такого антигену в концентрації 1 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 8,2, що містив 140 мМ хлористого натрію.

Сироватки крові корів було взято в різних господарствах Полтавської області. Усі

сироватки попередньо перевіряли у РІД. Для досліджень імунним біосенсором на основі ППР готували різні розведення сироваток у 1 мМ-трис-НСІ-буфері, рН 7,4, що містив 140 мМ хлористого натрію (ЗФР).

1% -й розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА), отриманого від фірми Sigma (США), готували, використовуючи ЗФР.

Для модифікації поверхні перетворювача застосовували додекантіол та поліелектроліти. Хімічну сорбцію додекантіолу HS(CH₂)₁₁CH₃ здійснювали, занурюючи виготовлену пластинку з нанесеним шаром золота в 1 мМ розчин етанолу при кімнатній температурі на 15 год, після чого промивали чистим етанолом і висушували у потоці повітря.

Поліелектролітна нерозчинна плівка на поверхні золота формувалась за допомогою поліаліламіну гідрохлориду (ПАА). Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/мл, час експозиції 30 хв, при кімнатній температурі. Поверхню промивали дистильованою водою.

У разі застосування декстрану сульфату (5 kDa) його розчин в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 4,0, концентрація 2 мг/мл, наносили на поверхню і витримували там 25 хв, а потім поверхню промивали буфером.

Тестування сироваток на наявність у них антитіл, специфічних до білків ретровірусу, проводили, як описано раніше [3].

Результати та обговорення

Важливою вимогою до роботи біосенсора є стабільність і відтворюваність результатів досліджень. Тому одним з основних завдань, які мають бути вирішені на шляху впровадження у практику розробленого нами раніше [10] біосенсорного методу діагностики ретровірусного лейкозу ВРХ, є забезпечення ефективної стандартизованої іммобілізації біологічного матеріалу та оптимізація функціональних параметрів ППР-біосенсора.

У попередніх експериментах на моделі взаємодії антиген-антитіло досліджено й проаналізовано ефективність іммобілізації біологічного матеріалу на поверхні перетворювача ППР, укрітій різними біологічними та хімічними агентами (лектинами, додекантіолом, поліелектролітами та похідними декстрину), що було застосовано для створення функціонально стабільних уніфікованих чутливих елементів біосенсора [7]. Оскільки чутливість ППР біосенсора досить висока й достатня для проведення скринінгових експресних досліджень на лейкоз [3], то для інтеграції антигену на поверхні біосенсора

послугувались лише такими способами, які в інших випадках [10] були найпростішими і виявляли високу ефективність.

Модифікація поверхні перетворювача тіолами та поліелектролітами

У спеціальній серії досліджень доведено, що адсорбція антигену на поверхні перетворювача, вкритій шаром додекантіолу або поліелектроліту ПАА, є стабільною в часі й не руйнується під час промивання вимірювальної комірки ЗФР. Імобілізація антигену супроводжується зміною резонансного кута в межах 1 200–1 500 кут. с. Разом з тим показано, що в разі використання поліелектроліту кількість сорбованого на поверхні антигену була дещо більшою, а відгук біосенсора за імобілізації антигену був більш стабільним і відтворюваним порівняно з необробленою поверхнею, хоча достовірного підвищення концентрації антигену ВЛ на поверхні не відзначалось (рис. 1). Застосування додекантіолу також сприяє стабілізації моношару антигену ВЛ. Імобілізований у такий спосіб антиген зберігав майже стовідсоткову активність упродовж 3 місяців, тоді як антиген, нанесений на некриту поверхню, втрачав активність вже через 2–3 тижні.

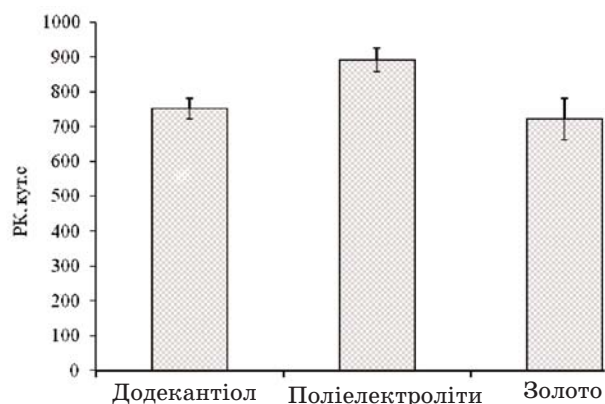


Рис. 1. Відгук ППР біосенсора на внесення антигену ВЛ з використанням різних типів поверхні

Оброблення поверхні 1%-м розчином БСА після сорбції антигену не вносить суттєвих змін у величину резонансного кута, що реєструється. Це, на нашу думку, означає, що на поверхні практично не залишається вільних місць зв'язування, а концентрація антигену є достатньою для створення максимально щільного шару. Зі введенням у вимірювальну комірку специфічної антисироватки корів, клінічно хворих на лейкоз, величина відгуку біосенсора корелює зі сту-

пенем її розведення. Таким чином, імобілізація антигену забезпечує селективне зв'язування специфічних антитіл із сироватки крові тварин. Утворення на поверхні біосенсора імунних комплексів спричинює зсув резонансного кута, пропорційний кількості антитіл у пробі.

Показано, що нанесення антигену на поверхню позитивно зарядженої поліелектролітної плівки підвищує відгук біосенсора на 15–20% порівняно з тим випадком, коли використовували необроблену поверхню біосенсорного перетворювача (рис. 2).

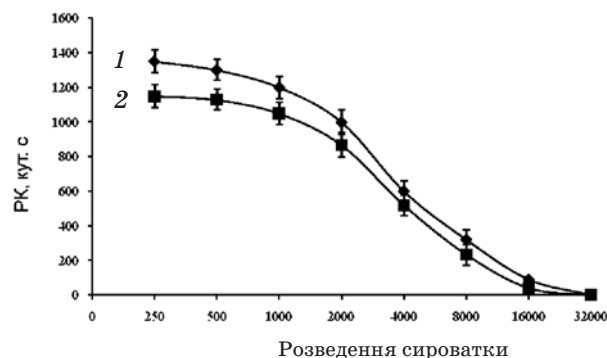


Рис. 2. Величина відхилення резонансного кута імунного сенсора на основі ППР під час дослідження сироваток корів:

1 — модифікована ПАА поверхня;
2 — некрита золота поверхня

Встановлено також, що модифікація трансдюсерної поверхні тіолами майже не впливає на чутливість аналізу, тобто відгук біосенсора під час визначення інтенсивності його специфічної імунної взаємодії з антитілами, що містились у сироватці крові, є приблизно таким, як і без попереднього застосування тіолів. Це зумовлено лише тим, що імобілізується більше антигену на поверхні, однак орієнтація антигенних детермінант на поверхні не є такою, що сприяє їх максимальній експозиції, як у разі, коли попередньо наносили поліелектролітний шар. Разом з тим, така модифікація стабілізує адсорбцію антигену, підвищуючи також відтворюваність результатів аналізів. Розбіжність результатів під час вимірювання однієї проби значно менша порівняно з випадком, коли антиген імобілізували безпосередньо на поверхні золота.

Таким чином, показано, що застосування додекантіолу та поліелектроліту ПАА для покриття шару золота на поверхні перетворювача дозволяє, передусім, підвищити відтворюваність роботи чутливих елементів оптичного імунного біосенсора на базі ППР. Проте кількість біологічних молекул,

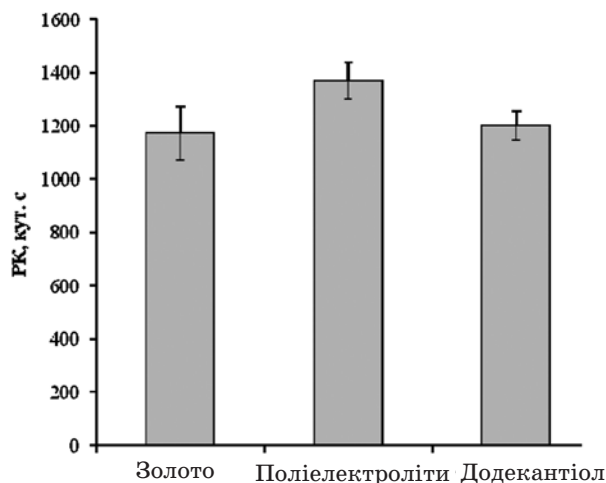


Рис. 3. Відгук ППР біосенсора на внесення антисироватки (1:500) з використанням різних типів поверхні

фіксованих на поверхні фізичною сорбцією або за допомогою проміжних шарів зазначених вище сполук, обмежена площиною поверхні перетворювача. Цьому обмеженню можна запобігти за допомогою сполук, які здатні формувати на поверхні розгалужені структури і в такий спосіб забезпечувати розташування біологічного матеріалу у тривимірному просторі. Таким чином кількість іммобілізованого матеріалу можна збільшити, підвищивши тим самим чутливість біосенсора.

У даній роботі запропоновано ще одну схему застосування поліелектролітів, коли полікатиони та поліаніони використовувались для формування подвійного розгалуженого шару біомолекул.

Така схема іммобілізації біологічного матеріалу була спочатку відпрацьована на традиційній для наших досліджень моделі антиген-антитіло: IgG людини та поліклональні антитіла кролика до імуноглобулінів людини.

Антитіла кролика у концентрації 200 мкг/мл в ЗФР, рН 8,0, адсорбували спонтанною фізичною сорбцією на поверхні перетворювача, інкубували 30 хв при кімнатній температурі, після чого комірку промивали ЗФР. Потім у комірку вносили розчин поліелектролітів у послідовності ПАА — ПСС — ПАА. Концентрація кожного поліелектроліту становила 1 мг/мл, час інкубації — 20 хв. Далі у комірку знову вносили антитіла кроля до імуноглобулінів людини в такий самій концентрації, витримували 20 хв і промивали ЗФР. Потім у комірку додавали 0,5% глутарового альдегіду. Після інкубації протягом 10 хв поліелектроліти вимивали 0,01 М

трис-НСІ-буфером, змінюючи рН від 4,0 до 8,0 і руйнуючи електростатичні зв'язки між IgG та поліелектролітами. Таким чином, на поверхні перетворювача формується не моношар, а подвійний шар антитіл за рахунок ковалентних зв'язків між молекулами IgG, утворених за допомогою глутарового альдегіду (рис. 4). Насамкінець у комірку вносили розчин IgG людини в діапазоні концентрацій від 1 нг/мл до 100 мкг/мл у ЗФР та фіксували відгук імуносенсора. Зміщення резонансного кута було пропорційне концентрації IgG людини у розчині.

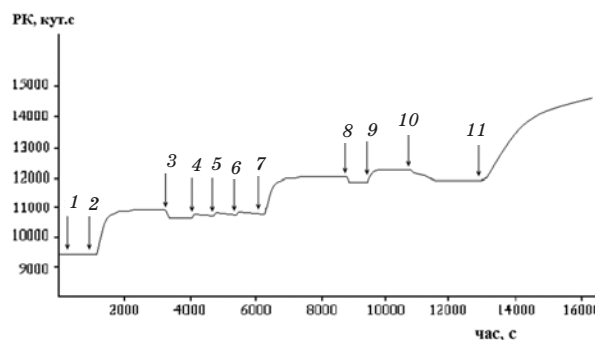


Рис. 4. Відгук ППР імуносенсора на внесення біологічних та хімічних компонентів:

- 1 — дистильована вода;
- 2 — поліклональні антитіла кролів до IgG людини;
- 3 — ЗФР;
- 4, 5, 6, — ПАА, ПСС, ПАА, відповідно;
- 7 — поліклональні антитіла кролів до IgG людини;
- 8 — ЗФР;
- 9 — глутаровий альдегід;
- 10 — 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН 4 та рН 8;
- 11 — IgG людини, 100 мкг/мл

Показано, що підготовка чутливої поверхні у такий спосіб дозволяє значно підвищити чутливість аналізу, яка в даному разі становила 20 нг/мл, причому лінійний відрізок графіка залежності ППР сигналу від кількості IgG людини у розчині знаходиться в діапазоні концентрацій від 100 нг/мл до 100 мкг/мл. Чутливість імуносенсора з використанням моношару антитіл, сформованого на некритій поверхні золота, становила 100 нг/мл, лінійна ділянка графіка лежить у межах 1–10 мкг/мл (рис. 5). Встановлено, що формування на поверхні перетворювача багатошарової (тривимірної) розгалуженої структури з антитіл за допомогою поліелектролітів та глутарового альдегіду дозволяє значно підвищити чутливість ППР імуносенсора.

Аналогічну схему було використано і для іммобілізації антигену ВЛ. Розчин антигену ВЛ у концентрації 0,5 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 8,2, вносили у вимірювальну

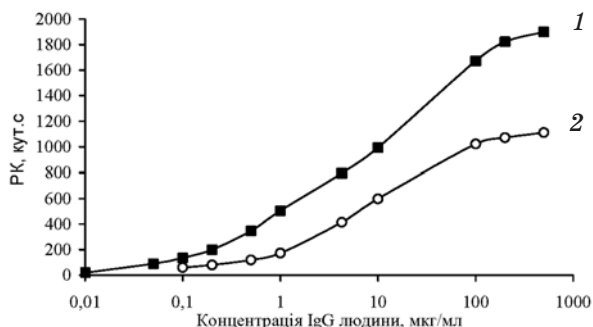


Рис. 5. Відгук ППР біосенсора на внесення розчину IgG людини у діапазоні концентрацій від 10 нг/мл до 500 мкг/мл за різних варіантів чутливої поверхні:

- 1 — подвійний шар антитіл, створений за допомогою поліелектролітів;
- 2 — моношар антитіл, сформований на невикритій золотій поверхні

комірку та інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Потім комірку промивали зазначеним буфером і послідовно вносили поліелектроліти ПАА — ПСС — ПАА в концентрації 1 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері з відповідним рН. Комірку промивали буфером і вносили розчин антигену ВЛ. Інкубували 20 хв і промивали буфером. Далі додавали 0,5% -й розчин глутарового альдегіду, витримували 15 хв, після чого видаляли поліелектроліти 50 мМ трис-НСІ буфером, змінюючи рН від 4,0 до 8,0. Сформовану таким чином двошарову чутливу поверхню використовували для дослідження антисироваток.

В експерименті досліджено 3 групи сироваток крові ВРХ. Перша група — це сироватки, позитивні за даними РІД та методу ELISA. Титр таких сироваток у РІД становив від 1:64 до 1:256. Для проведення методу ELISA використовували тест-систему IDEX (США). Друга група — це сироватки, негативні за результатами РІД, але позитивні за даними методу ELISA. І нарешті, третя група — це сироватки, негативні за результатами РІД та ELISA. Кожну пробу сироватки у розведенні 1:200 в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 7,4, вносили у вимірювальну комірку і фіксували специфічний сигнал. Утворення на поверхні біосенсора імунних комплексів супроводжувалось зміною резонансного кута. На рис. 6 наведено середні значення одержаних даних тестування перших двох груп. У пробах третьої групи сироваток, негативних за результатами двох традиційних методів РІД та ELISA, за допомогою імуносенсорного аналізу специфічних антитіл до ВЛ також не виявлено.

Встановлено, що формування подвійного шару антигену ВЛ на поверхні перетворюва-

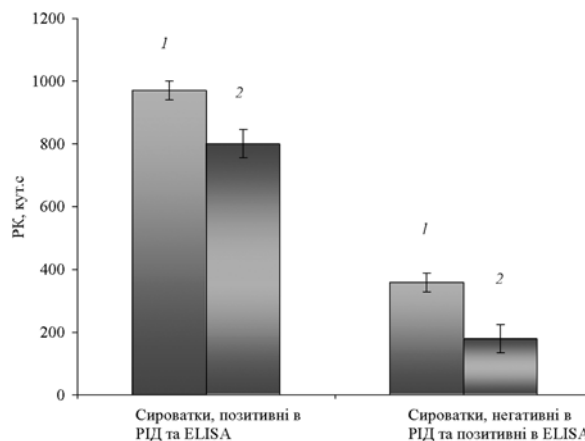


Рис. 6. Відгук ППР біосенсора на внесення розчину сироватки крові ВРХ у розведенні 1:500 за різних варіантів чутливої поверхні:

- 1 — подвійний шар антигену ВЛ, створений за допомогою поліелектролітів;
- 2 — моношар антигену ВЛ, сформований на невикритій золотій поверхні

ча істотно підвищує чутливість сенсора до специфічних антитіл. Це має особливе значення під час дослідження тварин на ранніх етапах захворювання, коли титр специфічних антитіл невисокий. Оскільки поверхню готують заздалегідь, то на експресність аналізу це не впливає.

Модифікація поверхні за допомогою декстранів

Антиген ВЛ іммобілізували на поверхню, вкриту сульфатом декстрану. Похідні декстрану мають розгалужену структуру і створюють на поверхні більшу кількість сайтів зв'язування порівняно з чистою (необробленою) поверхнею [5]. Розчин антигену ВЛ у концентрації 0,5 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 6,0, вносили у вимірювальну комірку й інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Потім комірку промивали зазначеним буфером і після блокування вільних місць зв'язування вносили зразки сироватки та фіксували зміщення резонансного кута.

Іммобілізація антигену супроводжується зміною резонансного кута в межах 1 600 –1700 кут. с, що на 200–250 кут. с більше порівняно з невикритою поверхнею. Відгук сенсора був більш стабільним і відтворюваним, ніж тоді, коли використовували необроблену поверхню золота, — розбіжність у значенні зсуву резонансного кута в разі іммобілізації одного й того самого зразка антигену була мінімальною, у межах 30–60 кут. с. Разом з тим, у разі вико-

ристання попередньо необробленої поверхні розбіжність результатів від пластинки до пластинки перетворювача становить 15–20%. Збільшення кількості адсорбованого антигену на поверхні сприяє підвищенню чутливості біосенсора до виявлення антитіл у розчині. Після внесення антисироватки спостерігали на 20% більший відгук біосенсора порівняно з необробленою поверхнею (рис. 7). Недоліком такого способу модифікації є висока вартість декстранів.

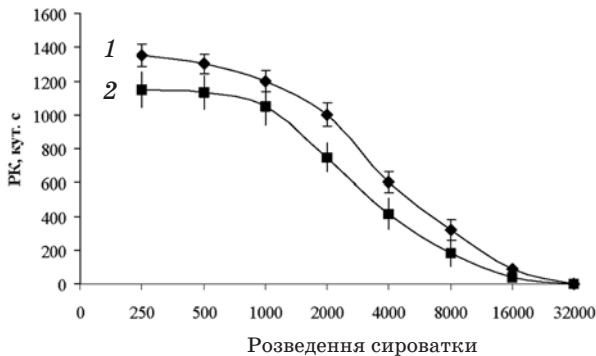


Рис. 7. Величина відхилення резонансного кута імуносенсора на основі ППР під час дослідження сироваток корів: 1 — модифікована декстраном поверхня; 2 — невкрита золота поверхня

Щоб зробити підсумок, ми порівняли результати наших досліджень, одержані за різних способів підготовки поверхні перетворювача біосенсора. Було відібрано 8 сироваток крові корів, для яких рівень екстинкції за даними методу ELISA становив 2,0–2,5 опт. од. Проби розводили ЗФР у співвідношенні 1:500 і вносили їх у вимірювальну комірку після іммобілізації антигену відповідним чином на підготовленій поверхні перетворювача. Далі реєстрували відгук біосенсора. На рис. 8 подано середні значення одержаних даних. Підтверджено, що найбільша чутливість притаманна біосенсору, на поверхні перетворювача якого сформовано подвійний шар антигену за допомогою поліелектролітів. В інших випадках, зокрема в разі застосування тіолових та декстранових покриттів, суттєвого підвищення чутливості не спостерігалось.

Таким чином, було проаналізовано ефективність іммобілізації селективного біологічного матеріалу на поверхні перетворювача ППР, попередньо вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами та похідними декстрану), для створення функціонально стабільних уніфікованих

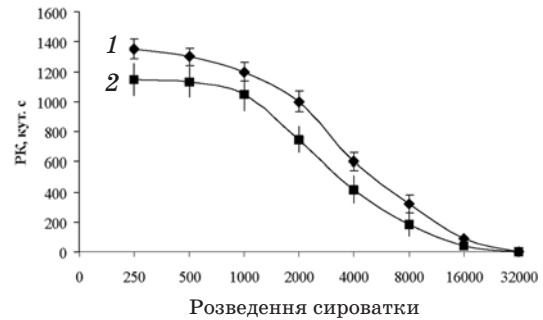


Рис. 8. Відгук ППР біосенсора на внесення розчину сироватки крові ВРХ у розведенні 1:500 за різних варіантів чутливої поверхні:

- 1 — невкрите золото;
- 2 — додекантіол;
- 3 — золото, вкрите шаром ПАА;
- 4 — подвійний шар антигену;
- 5 — декстран

чутливих елементів оптичного імуноного біосенсора на базі ППР та оптимізації функціональних параметрів ППР біосенсора.

Оскільки чутливість та специфічність ППР біосенсора є достатньо високою для проведення експресного аналізу проб з метою виявлення хворих на лейкоз тварин, то нема потреби застосовувати високовартісні сполуки та ускладнювати алгоритм проведення аналізу. Використання поліелектролітів для модифікації поверхні перетворювача імуноного біосенсора на базі ППР є найбільш доцільним, дешевим і простим.

Також слід додати, що загальна тривалість аналізу розробленим імуноним біосенсором становить лише понад 40 хв, включаючи час, витрачений на іммобілізацію антигену на поверхні трансдюсера, блокування вільних місць зв'язування та промивання вимірювальної комірки. Сама ж процедура тестування сироваток не перевищує 10 хв, і це робить аналіз експресним, особливо зважаючи на те, що поверхня трансдюсера обладнана змінними пластинками, які можуть бути попередньо підготовлені і використані в разі потреби. У наших дослідках вже одержано результати, які демонструють стабільність таких поверхонь протягом трьох і більше місяців. Спостереження тривають і далі, а отже є надія, що зазначений термін може бути значно довшим. Імунобіосенсорний аналіз можна проводити і в польових умовах, а приладова частина для його здійснення може мати портативний вигляд. Усе це створює умови для простого, швидкого та дешевого скринінгу лейкозу безпосередньо в господарствах або ж на карантинних станціях.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I.* Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing // *Sensors & Actuators B.* — 1983. — № 4. — P. 299–304.
2. *Kooyman R. P. H., Kolkman H., van Gent J. et al.* Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations // *Anal. Chim. Acta.* — V. 213. — 1988. — P. 35–45.
3. *Пирогова Л. В., Нагаєва Л. І., Стародуб М. Ф.* Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, № 3. — С. 88–92.
4. *Starodub N. F., Starodub V. M.* Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold // *Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry: NATO Proceedings / Ed. F. Bozoglu et al.* — Cluver Acad. Publ., 2001. — P. 63–94.
5. *Starodub N. F., Nabok A. V., Starodub V. M. et al.* Immobilization of biocomponents for immune optical sensor // *Ukr. Biochem. Zhurn.* — 2001. — V. 73, N4. — P. 55–64.
6. *Nakamura R., Muguruma H., Ikebukuro K. et al.* A plasma polymerized film for surface plasmon resonance immunosensing // *Anal. Chem.* — V. 69. — 1997. — P. 4649–4652.
7. *Пирогова Л. В., Стародуб М. Ф.* Імобілізація імуноглобулінів за допомогою лектинів при створенні імунних сенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, № 2. — С. 45–50.
8. *Иммунология: В 3 томах / Под. ред. У. Пола.* — 1987. — Т. 1. — С. 255–313.
9. *Стародуб М. Ф., Стародуб В. М.* Біосенсори: витоки, досягнення і перспективи // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, №4–5. — С. 147–163.
10. *Starodub N. F., Pirogova L. V., Demchenko A., Nabok A. V.* Antibody immobilization on the metal and silicon surface. The use of self-assembled layers and specific receptors // *Bioelectrochemistry.* — 2005. — V. 66, N 1–2. — P. 111–115.

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИГЕНА
РЕТРОВИРУСА ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
НА ПОВЕРХНОСТИ ИМУННОГО
БИОСЕНСОРА**

Л. В. Пирогова, М. Ф. Стародуб

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: lyudmilasy@ukr.net

Проанализирована эффективность иммобилизации антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота на поверхности преобразователя, покрытой различными химическими агентами (додекантиолом, полиэлектролитами и производными декстрана) для создания функционально стабильных унифицированных чувствительных элементов оптического иммунного биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что использование полиэлектролитов полиалиламина гидрохлорида и полистиренсульфоната для модификации поверхности преобразователя указанного биосенсора является наиболее целесообразным, дешевым и простым при проведении скрининговых исследований. Сменные пластинки, применяемые в качестве преобразователя, могут быть подготовлены заблаговременно и использованы по мере надобности.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, вирусный лейкоз, диагностика, иммунобиосенсорный анализ, поверхностный плазмонный резонанс, додекантиол, полиэлектролиты, декстран.

**IMMOBILIZATION OF BOVINE LEUCOSIS
ANTIGEN ON THE TRANSDUCER SURFACE
OF BIOSENSOR**

L. V. Pyrogova, M. F. Starodub

Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: lyudmilasy@ukr.net

Efficiency of immobilization of bovine leukaemia virus (BLV) antigen on the transducer surface of SPR biosensor by using of various agents (polyelectrolyte selfassembly, dodecantiol, dextran sulphate) was investigated. This technique was compared with direct immobilisation of the immune components on the bare gold. It was shown that modification of sensor surface with polyelectrolytes is most expedient and chip for screening of bovine leukosis.

Key words: bovine leucosis, bovine leukaemia virus, diagnostics, immune sensor analysis, surface plasmon resonance, dodecantiol, polyelectrolytes, dextran.