

Биосенсоры для осуществления мероприятий экологического мониторинга: классификация и особенности разработки

© 2017. Д. Л. Поклонский¹, д. т. н., заместитель начальника,
О. Ю. Дурилов¹, заместитель начальника,
Д. А. Зыгин¹, к. х. н., начальник отдела,
В. А. Воронин², к. т. н., начальник,
А. Ю. Исаева², к. б. н., н. с., Н. В. Ермилов¹, м. н. с.,

¹Научно-исследовательский центр Федерального государственного бюджетного учреждения «48 научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад, 6,
²Научно-исследовательский центр Федерального управления по безопасному хранению и уничтожению химического оружия 115487, Россия, г. Москва, ул. Садовники, 4-а, e-mail: fubhuho@mail.ru

Несколько способов классификации биосенсоров являются ключевыми в данной работе: по способу детектирования целевого анализата; по типу используемых биорецепторов; по механизму преобразования сигнала. Рассмотрены основные классы биосенсорных систем. Изложены основные подходы и особенности их разработки. В статье отмечено, что биосенсорные системы используются в различных сферах деятельности, поэтому актуальной проблемой для различных отраслей пищевой промышленности, клинической медицины и экологии являются мероприятия экологического и санитарно-эпидемиологического мониторинга. Основные усилия разработчиков биосенсорных систем направлены на интеграцию биосенсоров в уже сложившуюся систему детектирования возбудителей инфекционных заболеваний, которая традиционно включает методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), методы подсчёта колоний микроорганизмов и иммунологические методы. В статье разобраны основные типы биосенсоров и выявлены их преимущества и недостатки. Рассмотрены и показаны перспективы использования данных сенсоров для решения задач экологического и биологического контроля. В работе подчёркивается, что аналитические возможности биосенсорных систем достаточно обширны, и это открывает новые возможности для их применения при проведении комплексных наблюдений за состоянием окружающей среды, в том числе компонентов природной среды, естественных экологических систем, за происходящими в них процессами, явлениями, а также оценка и прогноз изменений окружающей среды.

Ключевые слова: биосенсорная система, экологический мониторинг, иммобилизация биомолекул, целевой анализ.

Biosensors for environmental monitoring activities: classification and design features

D. L. Poklonsky¹, O. Yu. Durilov¹, D.A. Zygin¹,
V.A. Voronin², A. Yu. Isaeva², N. V. Ermilov¹,

¹Scientific Research Center of the Federal budgetary institution “48 Research Institute” of Ministry of Defense of the Russian Federation, 6 Sergiev Posad, Moscow region, Russia, 141306,

²Research and Development center of the Federal Directorate for Safe Storage and Destruction of Chemical Weapons, 4a St. Sadovniki, Moscow, Russia, 115487, e-mail: fubhuho@mail.ru

The article considers the basic requirements for biosensors. Their classification for implementation of measures aimed at preventing, detecting, and suppressing legislation violation in the field of environmental protection, ensuring compliance with requirements of economic and other activities, including standards and regulatory documents, is given. Several ways of classifying biosensors are keystone in this work: by the method of detecting the target analyte; by the type

of bioreceptors used; on the mechanism of signal conversion. The main classes of biosensor systems are also considered. The main approaches and features of their development are outlined. The article notes that biosensor systems are used in various fields of activity, therefore, an urgent problem for various branches of the food industry, clinical medicine, and ecology are measures of ecological and sanitary-epidemiological monitoring. The main efforts of developers of biosensor systems are aimed at integrating biosensors into the already established system of detecting pathogens of infectious diseases, which traditionally includes technique of polymerase chain reaction (PCR), methods of counting microorganism colonies, and immunological methods. The main types of biosensors are analyzed in the article and their advantages and disadvantages are revealed. The prospects of using these sensors for solving environmental and biological control problems are considered and shown. The work emphasizes that the analytical capabilities of biosensor systems are quite extensive, and this undoubtedly opens up new possibilities for their application in carrying out complex observations of the state of the environment, including components of the natural environment, natural ecological systems, processes occurring in them, phenomena, and also assessment and forecast of environmental changes.

Keywords: biosensory system, ecological monitoring, immobilization of biomolecules, target analyte.

Сенсором называется устройство, преобразующее информацию о наличии специфического химического соединения (аналита) в удобный для преобразования (детектируемый) сигнал.

В общем случае сенсор содержит два компонента – рецепторную систему химического распознавания (рецептор) и преобразователь сигнала (трансдьюсер), основанный на химическом или физическом принципе.

Таким образом, биосенсоры – это вид сенсоров, в которых система распознавания имеет биохимическую природу и основана на реакциях с участием биомолекул либо надмолекулярных биологических структур [1]. В биосенсорах система распознавания находится в непосредственном контакте с преобразователем сигнала (рис. 1) [1, 2].

Одним из главных требований, предъявляемых к биосенсорам, является селективность биорецептора к специфичному целевому аналиту и способность сохранять

селективность при наличии других веществ в пробе [3]. Селективность зависит от способности биорецептора связываться с аналитом. Высокоселективные системы биологического распознавания разрабатываются с использованием биорецепторов биологического происхождения (антитела, лиганды и др.) или созданных по образу биологических систем (искусственные распознающие элементы: аптамеры, пептиды, полимеры, полученные методом молекулярной печати) [4]. Другое важное требование, предъявляемое к биосенсорам, – чувствительность. Чувствительность зависит от множества факторов, включая геометрию сенсорной (чувствительной) поверхности [5], свойств материала сенсора [6], химических свойств поверхности, используемой для иммобилизации биорецепторов [7, 8].

При классификации важно разделять биосенсоры и аналитические системы, требующие дополнительные стадии пробоподготовки и

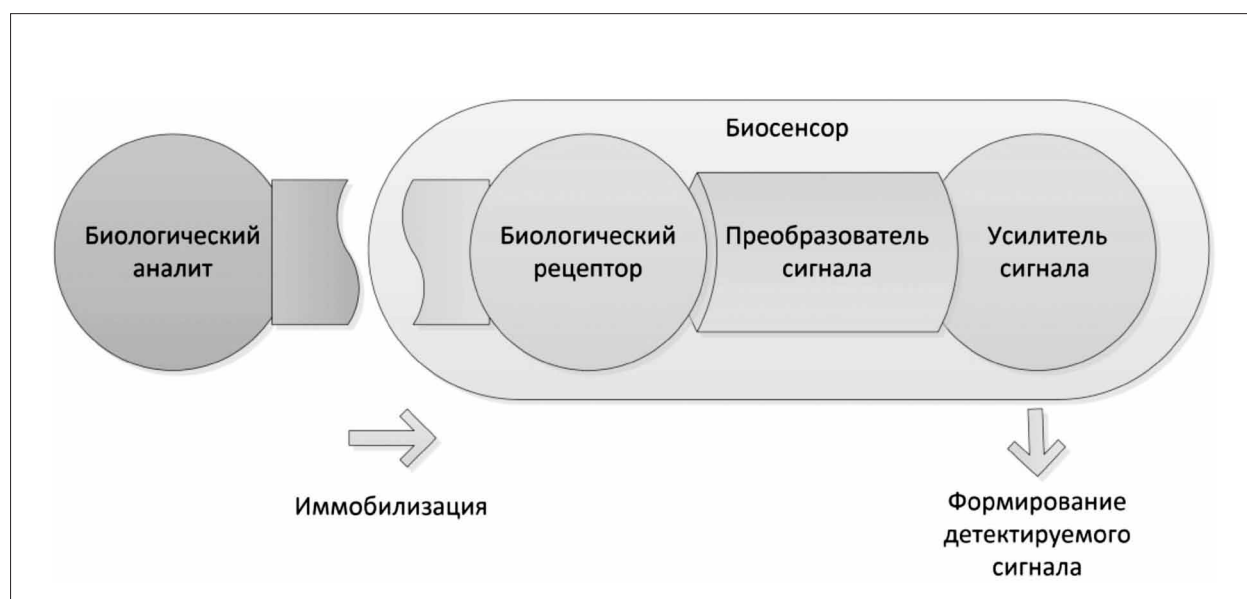


Рис. 1. Принципиальная схема биосенсора

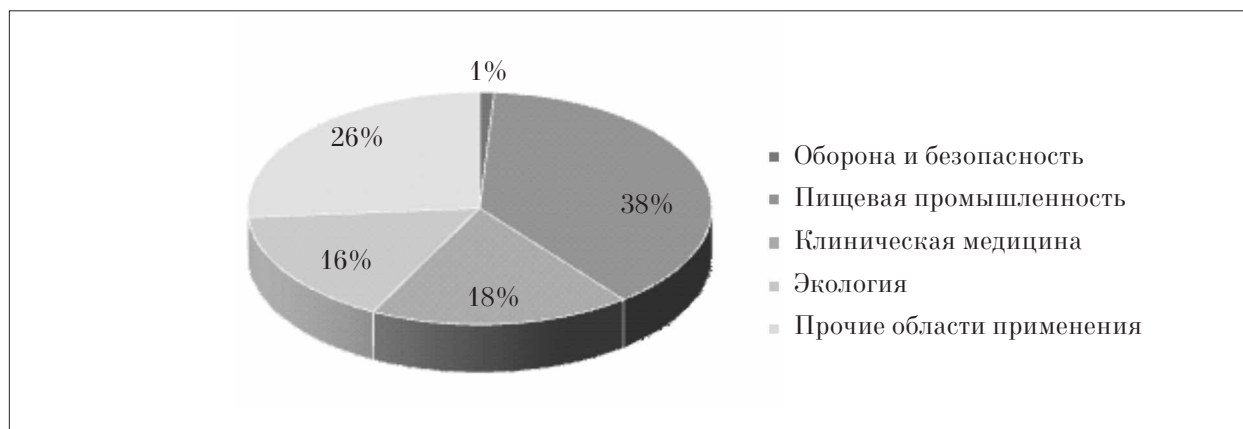


Рис. 2. Использование биосенсорных систем в различных сферах деятельности

разделения пробы (различные виды хроматографии, проточная цитометрия и пр.) [1].

Часто даже в специализированной литературе термины «биосенсор» и «биочип» используются как синонимы, при этом в отличие от общепринятого определения биосенсора, в определение «биочип» многие исследователи вносят своё понимание этой системы. В целом в качестве биочипов можно рассматривать биосенсоры, выполненные по технологиям микроэлектроники и использующиеся для доставки, обработки, анализа или обнаружения биологических молекул и объектов [9].

Биосенсоры как технические системы. Проблемы выявления аналитов в пробах окружающей среды и клинических образцах

Проведение мероприятий экологического и санитарно-эпидемиологического мониторинга является актуальной проблемой для различных отраслей пищевой промышленности, клинической медицины и экологии (рис. 2) [10].

В настоящее время усилия разработчиков биосенсорных систем направлены на интеграцию биосенсоров в сложившуюся систему детектирования возбудителей инфекционных заболеваний, традиционно включающую методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), методы подсчёта колоний микроорганизмов и иммунологические методы.

Методы подсчёта колоний микроорганизмов и культуральные методы продолжают оставаться стандартом для микробиологических исследований, несмотря на их трудоёмкость и длительность получения результата. Так, в случае специфического анализа на *Campylobacter* spp. время получения отрицательного результата составляет 4–9 дней, а для подтверждения

положительного результата необходимо ждать 14–16 дней [11]. Как правило, такие сроки неприемлемы для клинических исследований и анализа в различных отраслях промышленности. Для дифференциальной диагностики патогенных микроорганизмов используют селективные среды культивирования. Подобные среды могут содержать ингибиторы для подавления роста нецелевых видов микроорганизмов или специфические субстраты, подходящие для роста определённых микробов (например, радужный агар для выявления *Salmonella* spp.) [12]. Анализ осуществляется с помощью оптических методов и визуального осмотра колоний.

Иммунологические методы остаются одним из наиболее мощных аналитических инструментов обнаружения микроорганизмов при решении различных задач. Помимо традиционных методов (реакция геммагглютинации, иммуноферментный анализ, различные варианты иммунохроматографии) в арсенале современных иммунологических методов находится иммуномагнитная сепарация (IMS), комбинируемая с различными методами детектирования [13].

Полимеразная цепная реакция основана на технологии амплификации нуклеиновых кислот, которая была предложена в середине 80-х гг. XX века. Технология базируется на выделении, амплификации и определении количества копий коротких фрагментов ДНК, содержащихся в геноме выявляемого микроорганизма. В настоящее время существуют различные варианты постановки амплификационного анализа: ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), мультиплексная ПЦР (мПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [14–16].

Существует несколько классов биологических рецепторов, которые используются в

биосенсорных системах. Основными классами рецепторов являются ферменты, антитела и нуклеиновые кислоты. При этом в ходе обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний прослеживается тенденция использования ферментов преимущественно в качестве меток, а не специфических элементов распознавания бактерий [10]. Ферменты используются для маркировки антител и ДНК-зондов, как это имеет место в ходе традиционного иммуноферментного анализа. Большая часть коммерчески доступных биосенсоров содержит в своём составе маркированные ферментами антитела. В зависимости от способа получения антитела классифицируются на моноклональные, поликлональные и рекомбинантные. От класса, к которому относятся антитела, зависит также их селективность.

Основные типы биосенсоров, их преимущества и недостатки

Существует несколько способов классификации биосенсоров: по способу детектирования целевого аналита; по типу используемых биорецепторов; по механизму преобразования сигнала.

В настоящее время используются две группы способов детектирования целевого аналита: с использованием специальных меток и красителей (label-based); без использования специальных меток и красителей (label-free). Перечень методов детектирования, которые могут использоваться для обоих случаев, представлен в таблице 1. В зависимости от природы сигнала и механизма его преобразования биосенсоры можно классифицировать на следующие группы: механические; опти-

Таблица 1

Классификация биосенсоров в зависимости от наличия специальных меток и красителей

Детектирование с меткой	Безметочное детектирование		
	оптическое	механическое	электрическое
– ELISA; – FRET; – использование квантовых точек	– поверхностный плазмонный резонанс; – интерферометрия; – эллипсометрия; – метод резонансного зеркала	– использование кантилевера; – использование наномеханического осциллятора; – метод микробаланса кварцевого кристалла	– использование полевых транзисторов (ISFET, EnFET, HFET, NanowireFET); – использование микрофлюидных электрохимических устройств (μ PED)

Таблица 2

Классификация биосенсоров в зависимости от способа преобразования сигнала и используемых методов детектирования [8]

Механизм преобразования	Метод
Механический	– изменение/определение поверхностного напряжения – изменение/определение массы – изменение/определение резонансной частоты
Оптический	– флуоресценция – хемолюминесценция – биолюминесценция – поверхностный плазмонный резонанс – рассеивание – интерферометрия затухающих волн
Электрический	– определение проводимости – определение ёмкости – определение сопротивления
Пьезоэлектрический	– микробаланс кварцевого кристалла (QCM) – поверхностная акустическая волна
Электрохимический	– потенциометрия – вольтамперометрия – использование ион-селективного полевого транзистора (ISFET) – использование химически чувствительного полевого транзистора (ChemFET)
Термальный	– калориметрия

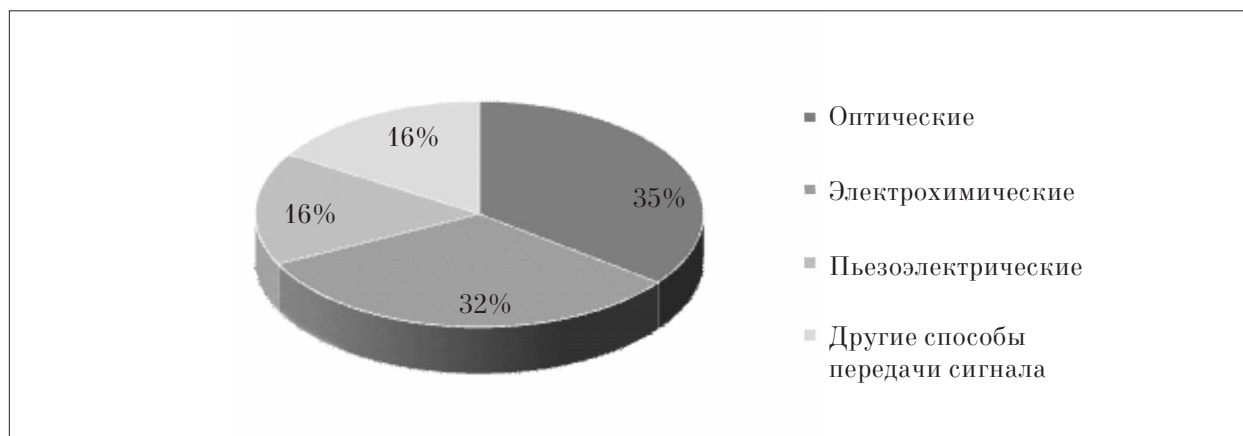


Рис. 3. Способы преобразования сигнала, используемые в конструкциях биосенсоров

Таблица 3

Классификация биосенсоров в зависимости от типа рецептора

Рецептор	Тип биосенсора
Фермент	Аффинный / Каталитический
Антитело / Антиген	Аффинный (иммуносенсор)
Нуклеиновые кислоты / ДНК	Каталитический
Искусственный (синтетические) биоматериал	Аффинный
Клеточные структуры / Клетки	Каталитический
Ионофор	Аффинный

ческие; электрические; пьезоэлектрические; электрохимические; термальные (табл. 2).

Электрические и электрохимические биосенсоры основаны на измерении электрических величин, которые изменяются в системе при взаимодействии между рецептором и аналитом.

Потенциометрические сенсоры формируют аналитический сигнал как разность потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения, иммобилизованными в полупроницаемую мембрану. При этом ион-селективный электрод (ISE) используется в качестве преобразователя/усилителя сигнала. Наиболее распространённый тип потенциометрических сенсоров – это pH-электроды [17].

Вольтамперометрические сенсоры позволяют осуществлять обнаружение аналитов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. Между рабочим электродом и электродом сравнения устанавливается фиксированная величина разности потенциалов, после чего осуществляют контроль за изменением напряжения в цепи, которое пропорционально концентрации одного из продуктов аналитической реакции [18].

Кондуктометрические сенсоры осуществляют измерение проводимости раствора в

ходе протекания аналитической реакции. Кондуктометрические сенсоры мало пригодны для использования в каталитических реакциях, но широко применяются в реакциях, где осуществляются аффинные взаимодействия.

Импедансные сенсоры основаны на измерении сопротивления в электрохимической ячейке или на фиксировании изменения сопротивления при варьировании вольтамперметрических характеристик [2].

Сенсоры на основе полевых транзисторов основаны на использовании ион-селективных электродов в традиционных потенциометрических системах, при этом входной транзисторный элемент помещается в анализируемый раствор. Это существенно повышает разрешающую способность и улучшает аналитические возможности биосенсора. Чувствительный слой биосенсора располагается непосредственно на поверхности ион-селективного электрода, представляя собой ворота полевого транзистора. Использование подобных биосенсоров даёт возможность непосредственного обнаружения коротких белков и пептидов по величине их заряда [19].

Существенным ограничением при использовании электрических и электрохимиче-

ских биосенсоров является чувствительность аналитических систем к буферной ёмкости раствора.

В коммерчески доступных биосенсорных системах для выявления возбудителей инфекционных заболеваний наибольшее распространение получили биосенсоры на основе оптических и электрохимических методов (рис. 3) [10].

Биосенсоры можно классифицировать на два типа в зависимости от биорецептора (табл. 3): аффинные и каталитические. Аффинные рецепторы не влияют или не изменяют целевой аналит (биомаркер), в то время как каталитические рецепторы катализируют биохимическую реакцию. Большинство ферментов относятся к каталитическим рецепторам. В случаях, когда ферменты не дают возможности обнаружить требуемые биомолекулы, прибегают к использованию антител, как высоко селективных рецепторов.

Наиболее широко используемыми биорецепторами являются: антитела; ферменты; нуклеиновые кислоты; искусственные (синтетические) биораспознающие элементы.

Для формирования аналитического сигнала в биосенсорах используют такие методы иммо-

билизации биологического аналита, как физическая адсорбция [10], ковалентное связывание [11], встраивание в матрицу [12], перекрёстное межмолекулярное связывание [13], мембранное связывание [14] и инкапсулирование [15], как это представлено на рисунке 4.

Физическая адсорбция основана на совместном действии Ван-дер-Ваальсовых, гидрофобных, водородных и ионных сил, вызывающих прикрепление биологического рецептора к поверхности сенсора. Для иммобилизации биомолекул широко используются подложки из целлюлозы, стекла, гидроксипатита и коллагена. Хотя реализация метода физической адсорбции довольно проста, образующееся взаимодействие является слабым и биомолекула с лёгкостью отделяется от подложки.

Ковалентное связывание предполагает модификацию поверхности сенсора, в результате которой образуются активные группы, способные эффективно связываться с рецепторными молекулами. В случае, когда рецептором биосенсора выступает фермент, иммобилизация осуществляется через функциональные группы, которые не являются существенными для ферментативной активности. Как пра-

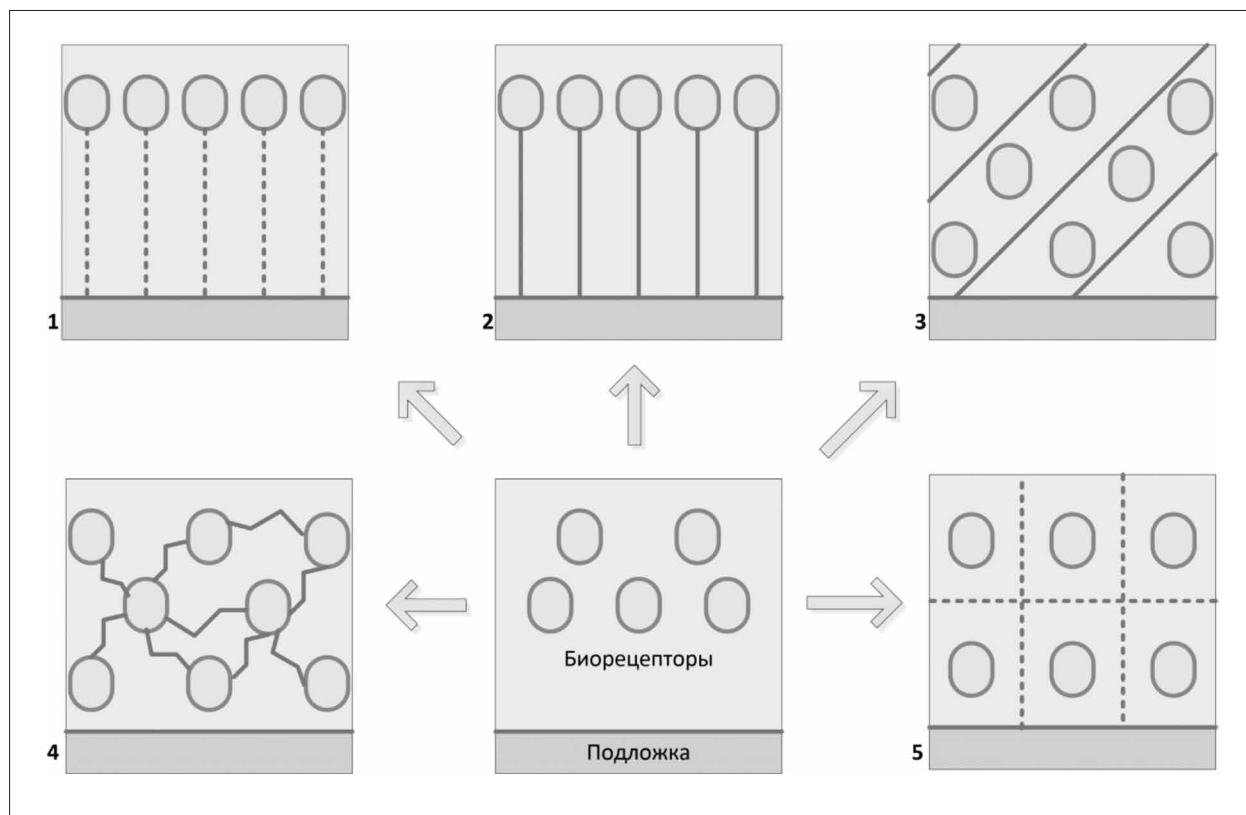


Рис. 4. Способы иммобилизации биорецепторов в подложке

1 – физическая адсорбция; 2 – ковалентное связывание; 3 – встраивание в матрицу из полимерного геля; 4 – перекрёстное межмолекулярное взаимодействие; 5 – инкапсулирование в пористую матрицу

вило, это нуклеофильные группы (амино-, карбоксильные, имидазольные, тиольные, гидроксильные). Ковалентное связывание позволяет решить проблемы нестабильности биомолекул, агрегации и диффузии, что даёт возможность получать биосенсоры с хорошими показателями плотности и равномерности распределения биорецепторов на поверхности сенсора.

Встраивание в матрицу из полимерного геля также позволяет закрепить биорецепторы на подложках. Для реализации данного способа подходят гелевые матрицы, содержащие полиакриламид, крахмал, поливинилловый спирт, поливинилхлорид, поликарбонаты, ацетат целлюлозы и силикагель. Со временем происходит вымывание биорецепторов из матрицы, что сопровождается снижением сенсорной активности.

Перекрестное межмолекулярное взаимодействие биомолекул с бифункциональными и мультифункциональными реагентами, такими, как глутаровый альдегид, гексаметилендиизоцианат, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол также используется для иммобилизации рецепторов на поверхности биосенсора. Недостатком данного способа является то, что образуемый активный участок является неоднородным и может включать несколько рецепторных слоев, образующих диффузионный барьер.

Инкапсулирование в пористую матрицу осуществляется с использованием системы «золь-гель». В качестве пористой матрицы используется оксид кремния, который даёт возможность использования оптических методов визуализации сигналов с поверхности биосенсора. Процессы в системе «золь-гель» протекают при комнатной температуре, что предотвращает денатурацию биомолекул, а образующиеся структуры обладают высокой стабильностью.

Иммобилизация биомолекул на поверхности является одним из ключевых этапов создания биосенсоров, в ходе которого необходимо учитывать целый ряд эксплуатационных требований. Это обеспечение функциональной активности и стабильности биомолекул, предотвращение химической инактивации. В связи с этим не существует универсальной стратегии иммобилизации и её приходится подбирать индивидуально с учётом особенностей биорецептора, матрицы, преобразователя сигнала и свойств пробы, которую предполагается анализировать.

При создании биосенсоров для выявления патогенных микроорганизмов наибольшее

распространение получили следующие способы иммобилизации рецептора [16–19].

Адсорбция на поверхности золота – является достаточно простым и быстрым способом иммобилизации, который предполагает прикрепление антител к субстрату в случайном порядке, без направленного пространственного ориентирования. Так как адсорбция рецепторов на поверхности золота является неспецифической, аналитические характеристики сенсора редко бывают высокими.

Авидин-биотиновые системы – позволяют быстро и надёжно прикрепить биорецепторы к покрытой авидином поверхности. Хотя константа аффинного взаимодействия между авидином и биотином является довольно высокой (10^{15} моль⁻¹ · л), само взаимодействие имеет нековалентную природу, что позволяет осуществлять множественную отмывку поверхности сенсора и использовать его повторно. К числу недостатков авидин-биотиновых систем относят высокую стоимость реагентов [20].

Монослойные структуры, способные к самосборке (self-assembled monolayers – SAMs), получают при эмульгировании плоских микрочастиц золота в растворителе в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ). Наибольшее распространение в качестве растворителя получили системы на основе этанола с добавками дисульфидов или тиолов [21]. Формирование и взаимодействие монослоёв осуществляется при реакции радикалов с сульфидными группами. Присоединение биорецептора происходит посредством тиольной группы.

Таким образом, аналитические возможности биосенсорных систем достаточно широки, что открывает возможности для их применения при проведении мероприятий экологического мониторинга.

References

1. Karyakin A.A., Ulasova E.A., Vagin M.Yu., Karyakina E.E. Biosensors: device, classification and functional characteristics // *Sensor*. 2012. No. 1. P. 16–23 (in Russian).
- [Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики // *Сенсор*. 2012. № 1. С. 16–23].
2. Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. Biosensors, fundamentals and applications // Oxford University Press, 1987. 770 p.
3. Collings A., Caruso F. Biosensors: recent advances // *Rep. Prog. Phys.* 1997. No. 60. P. 1397–1445.

4. Tamerler C., Sarikaya M. Molecular biomimetics: nanotechnology and bionanotechnology using genetically engineered peptides // *Phil. Trans. R. Soc. A*. 2009. V. 367. P. 1705–1726.
5. Ansari M., Cho C. Deflection, frequency, and stress characteristics of rectangular, triangular, and step profile microcantilevers for biosensors // *Sensors*. 2009. No. 9. P. 6046–6057.
6. Vasan A., Doraiswami R., Pecht M. Biocompatible polymer composite material for highly sensitive point-of-care bioMEMS microcantilever sensors // *Surface Mount Technology Association: SMTA International Conference*. 2010. V. 1. P. 17–26.
7. Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S., Courtois S., Louette P., Hevesi L., Remacle J. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays // *Anal. Biochem*. 2000. No. 280. P. 143–150.
8. Vasan A., Doraiswami R., Mahadeo D. Point-of-care biosensor systems // *Frontiers in Bioscience*. 2013. S. 5. P. 39–71.
9. Bashir R. Introduction to bio-chip, biosensors, bioMEMS. Laboratory of Integrated Biomedical Micro/Nanotechnology and Applications (LIBNA), School of Electrical and Computer Engineering, Department of Biomedical Engineering, Purdue University, West Lafayette, Indiana [Internet resource] <http://www.ece.purdue.edu/bashir> (Accessed: 12.10.2017).
10. Lazcka O., Del Campo F.J., Munoz F.X. Pathogen Detection: A perspective of traditional methods and biosensors // *Biosens. Bioelectron*. 2007. No. 22. P. 1205–1217.
11. Brooks B.W., Devenish J., Lutze-Wallace C.L., Milnes D., Robertson R.H., Berlie-Surujoballi G. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial // *Vet. Microbiol*. 2004. V. 103. P. 77–84.
12. Fratamico P.M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan Salmonella, and Transia Card Salmonella assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground // *Mol. Cell Probes*. 2003. V. 17. P. 215–221.
13. Gu H., Xu K., Xu C. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection // *Chem. Commun*. 2006. P. 941–949.
14. Hunt M. Real time PCR tutorial – Copyright 2006, the board of trustees of the University of South Carolina // *Nucleic Acids Research*. 1998. V. 26. P. 2150–2155.
15. Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A., Chalmers K.J. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping // *BMC Genomics*. 2008. No. 9:80. P. 1–12.
16. Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. Quantitative real-time RT-PCR. A perspective // *J. Mol. Endocrinol*. 2005. No. 34 (3). P. 597–601.
17. Korotkaya E.V. Biosensors: Design, classification and applications in the food industry // *Foods and Row Mat*. 2014. V. 2. No. 2. P. 161–171.
18. Karyakin A.A., Ulasova E.A., Vagin M. Yu., Karyakina E.E. Biosensors: design, classification and functional characteristics // *Sensor*. 2002. No. 1. P. 16–24.
19. Lud S.Q., Nikolaidis M.G., Haase I., Fischer M., Bausch A.R. Field effect of screened charges: electrical detection of peptides and proteins by a thin film resistor // *Chem. Phys. Chem*. 2006. V. 7. No. 2. P. 379–384.
20. Tombelli, S., Mascini, M., Piezoelectric quartz crystal biosensors: recent immobilization schemes // *Anal. Lett*. 20006. No. 33 (11). P. 2129–2151.
21. Su X.-L., Li Y. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7 // *Biosens. Bioelectron*. 2004. No. 19. P. 563–574.