МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 57.087:57.083.232

АНАЛИТЫ В БИОСЕНСОРАХ

И.А. Белых, А.М. Грек, А.В. Сакун, В.В. Марущенко, С.В. Гаташ

Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»
ул. Фрунзе, 21, Харьков 61002, Украина
sakun_71@mail.ru

Поступила в редакцию 17 июня 2010 г.
Принята 28 октября 2010 г.

В обзоре рассмотрены виды биораспознающих компонентов (аналитов) и методы их иммобилизации на поверхность трансдьюсера (электородах, поверхностях оптических и пьезодатчиках и др.). Показана возможность построения биосенсоров, в которых в качестве аналитов используют цианобактерии вида *Nostoc* и светящие бактерии *Vibrio*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биосенсор, трансдьюсер, иммобилизация аналитов, модификация поверхности трансдьюсера.

АНАЛІТИ У БІОСЕНСОРАХ

І.А. Бєлих, А.М. Грек, О.В. Сакун, В.В. Марущенко, С.В. Гаташ
Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»
вул. Фрунзе, 21, Харків 61002, Україна

В огляді представлено види біоозпізнавальних компонентів (аналітів) та методи їх іммобілізації на поверхню трансдьюсера (електродах, поверхнях оптичних та п'єзодатчиків, тощо). Показано можливість побудови біосенсорів, яких в якості аналізів використовують ціанобактерії виду *Nostoc* та бактерії, що світяться *Vibrio*.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: біосенсор, трансдьюсер, іммобілізація аналітів, модифікація поверхні трансдьюсера.

ANALYTES IN BIOSENSORS

I.A. Belykh, A.M. Grek, A.V. Sakun , V.V. Maruschenko, S.V. Gatash
National Technical University "Kharkov Polytechnical Institute" Frunze str. 21, Kharkov 61002,Ukraine

This review considers the types of biorecognizing components (analytes) and the methods of their immobilization on the transducer surface. The possibility of biosensor design with *Nostoc* cyanobacteria and *Vibrio* luminescent bacteria as analytes has been demonstrated.

KEY WORDS: biosensor, transducer, immobilization of analytes, modification of transducer surface.

Для определения содержания веществ в средах все шире используют различного рода устройства, в которых в качестве датчика применяют биологические аналиты (ферменты, антитела, клетки, отдельные организмы или их ткани). Эти устройства принято называть биосенсорами [1].

Сложности связанные с разработкой биосенсоров напрямую связаны с видом аналита и методами их иммобилизации на поверхности трансдьюсера. Отмеченные проблемы находят отражение в возросшем числе публикаций, посвященных биосенсорам [2],[3],[4],[5].

Таким образом, биосенсоры принадлежат к семейству молекулярных сенсоров включающих в себя селективную к определяемому веществу поверхность вблизи преобразователя или интегрированную в преобразователь, функцией которой является передача сигнала о взаимодействии между поверхностью и определяемым веществом либо непосредственно, либо через химический медиатор.

Независимо от метода распознавания или типа, используемого в анализе вещества, существует общая черта для биосенсоров всех типов: биораспознающий компонент иммобилизирован на поверхности преобразователя, где детектируется сигнал [1, 2, 3].

© И.А. Белых, А.М. Грек, А.В. Сакун, В.В. Марущенко, С.В. Гаташ, 2010

Главное требование к биораспознающему компоненту состоит в том, чтобы узнать только один субстрат среди множества других. Этому требованию отвечают четыре типа биологических объектов:

1. ферменты;
2. антитела;
3. рецепторы, клетки, ткани;
4. нуклеиновые кислоты.

В распознающих элементах биосенсоров чаще всего используют ферменты. Они могут присутствовать как в виде очищенной субстанции, так и в составе микроорганизмов или интактной ткани. Ферменты ускоряют протекание биохимических реакций и специфически связываются со своими субстратами. В биосенсорах их используют именно благодаря каталитическому действию.

Основой амперометрических биосенсоров являются электроды, которые модифицируются тем или иным ферментом. В последнее время широко применяются электроды, изготовленные на базе углерода, это толстопленочные электроды или screen-printed, стеклоуглеродные, углеводородные и угольные пастовые углероды. Модифицированные формазаном толстопленочные электроды позволяют определить медь, свинец, кадмий и цинк [4], а фенол и фенольные соединения обнаруживают с помощью пористого гидрофобного углеводородного электрода с иммобилизированным на нем ферментом тиразиназой [5], или угольного пастового электрода, содержащего фермент полифенолоксидазу [6].

Тирозиназный биосенсор позволяет определять не только фенол, но и метаболит допамина 3,4-дегидроксифенилуксусной кислоты [7].

Кроме тиразиназы и полифенолоксидазы для определения фенольных соединений используют лаккозу. Известно, что лаккоза катализирует окисление широкого круга фенольных соединений и аминов, а также некоторых неорганических ионов и сопутствующим восстановлением дикислорода непосредственно из воды [8]. Для иммобилизации фермента по поверхности стеклоуглеродного электрода наносят три типа полимерных материалов: положительно заряженные цетил-, етилполиэтапепитин (CEPEi), отрицательно заряженные коммерческие препараты Nafion и Eastman AQ29D [9].

На основе полимерной пленки Nafion с иммобилизованной на ней диметилсульфоксид-редуктазой, нанесенной на стеклоуглеродный электрод определяют диметилсульфоксид [10].

Большую группу ферментных биосенсоров составляют сенсоры для определения сахаров (глюкозы, фруктозы и др.). В качестве аналитов применяют такие ферменты, как D-фруктозодегидрогеназа, оксидаза, глюкозооксидаза [11, 12]. В качестве трансдьюсеров в таких биосенсорах используют не только электроды на основе углерода, но и золота, платины и других материалов. Для определения фруктозы фермент D-фруктозодегидрогеназу иммобилизуют на углеродном нанотрубчатом пастовом электроде, модифицированного электрополимеризованной пленкой 3,4-дегидроксибензальдегида [11], а для детектирования одновременно глюкозы и фруктозы, применяют аналиты из оксидазы глюкозооксидазы, дигидрогеназы фруктозы и тетратиофульвален-3 теркаптопропионовой кислоты, которые наносят монослоем на золотой электрод [12]. В проточно-инжекционной аппаратуре для определенения глюкозы, фермент глюкозооксидаза иммобилизируют на природной протеиновой мембране в тонком слое ферментной ячейки [13].

Улучшить параметры глюкозных биосенсоров можно за счет применения микродискового электрода, покрытого пленкой, содержащей фермент. Продукт ферментной реакции в сенсоре непосредственно реагирует с электродом. Микродиск из платины

(Pt-электрод), покрывают пленкой из поливинилового спирта, содержащей глюкозооксидазу [14].

Хорошей адсорбцией для ферментов: глюкозооксидазы, алкогольоксидазы и ферментной системы (алкогольоксидаза + пероксидаза) обладают электропроводные полимеры, такие как полианилин, полифенол, полипирол, поликарбазон, полиметааминофенол, электрохимически осажденные на поверхности платинового электрода [15].

Определение глюкозы на фоне альбумина и сывороточных белков весьма затруднительно, в связи с применением биосовместимого сенсора, основанного на использовании эффекта усиления поверхностно комбинационного рассеяния. Основой такого сенсора является алкантиолатный триэтиленгликолевый слой, концентрирующий глюкозу вблизи активной поверхности комбинационного рассеяния [16].

Помимо ферментов животного происхождения в биосенсорике широко применяются ферменты растительного происхождения, такие как пероксидаза хрена [17].

Для определения NO с использованием пиролитического графитового электрода применяют пероксидазу хрена и кизельгура [17], а полифенолы в растительных экстрактах определяют с помощью биосенсора, основанного на угольной пасте с пероксидазой хрена и ДНК, так называемые гибридные биосенсоры [18], иммобилизированной на $SiO_2 - TiO_2$ (окиси кремния и титана) [19]. В более современных биосенсорах с аналитом пероксидаза хрена для иммобилизации ферментов на тех или иных электродах, применяют наночастицы этого фермента. За счет такой иммобилизации осуществляется безреагентное детектирование H_2O_2 [17, 20, 22]. Кроме того, используя свойство H_2O_2 электрокаталитического воздействия в биосенсоре использовали электрод с адсорбированным красителем нейтрально красным, покрытым коллоидом наночастиц Ag^o (серебра) и фосфата Zr (цинка), который содержит также пероксидазу хрена, бычий сывороточный альбумин и глутаровый альдегид [21].

Анионная пероксидаза табака, по сравнению с традиционно используемой катионной пероксидазой из корней хрена, обладает более широким pH оптимумом стабильности, высокой устойчивостью против инактивации пероксидом водорода и большей эффективностью в процессах прямого переноса электронов. При ее иммобилизации на самоорганизующемся тиоловом монослое на золотом электроде намного превосходит пероксидазу хрена по чувствительности определения пероксида водорода независимо от заряда монослоя [22].

С помощью метода поверхностного плазменного резонанса, заложенного в биосенсоре с использованием в качестве мишеней яичного альбумина и пероксидазы хрена, тестируют загрязненность воздуха [23].

Все биосенсоры, которые основаны на ферментном ингибировании применяются для определения загрязнения окружающей среды и токсических соединений в различных пищевых продуктах [23, 24, 25]. В последнее время интерес к холинестеразным и другим ферментным сенсорам вновь привлекает внимание в связи с угрозой возможного химического терроризма.

Авторами Г.А. Евтюгиным, Г.К. Будниковым, А.Н. Ивановым [19] было проведено сравнительное изучение потенциометрических холинэстеразных сенсоров на основе стеклоуглеродных электродов, модифицированных полианилином различного строения. Химически синтезированный полианилин, допированный камфоросульфонной кислотой, показывает более высокий сигнал на субстраты холинестераз, тогда как полианилин, получаемый электрополимеризацией на тонком слое нафиона, обеспечивает более высокую чувствительность в определении пестицидов [26]. Посредством генети-

чески созданной нитроредуктозы с дополнительными сконструированными цистеиновыми аминокислотами, что дало возможность детектировать взрывчатые вещества [27].

Включение холинестеринэстеразы и холинестериноксидазы в проводящую полипирроловую пленку с использованием электрополимеризации позволило определять холинестерин [28].

Существует группа аналитов для определения лекарственных, витаминных и других препаратов.

Так антиоксидантную активность лекарственных и витаминных препаратов определяют с помощью фермента супероксид-дисмутазы [29].

Помимо амперометрических сенсоров для определения лекарственных препаратов и проведения различного рода биохимических аналитов применяются сенсоры, работающие на основе других трансдьюсеров, как, например, голографические биосенсоры для мочевины или пенициллина. Уреаза или пенициллиноза иммобилизировались на решетках, воспроизводящих голограммы отражения, которые меняют цвет в зависимости от концентрации субстрата в контрольных средах [30]. Для определения адреналина и изопреналина применяли интегрированную хемилюминесценцию. Сенсор основан на эффекте усиления аналитом эмиссии хемилюминесценции люминола, окисляемого перйодатом в щелочном растворе.

Аналитические реагенты люминол и перйодат иммобилизируют на ионообменной смоле [31], в качестве носителей аналитов широко применяют пористые мембраны с хемилюминесцентной детекцией [32].

Сенсоры на основе антител или рецепторов называют аффинными биосенсорами [33].

Наиболее селективными и чувствительными по отношению к бактериям являются иммуноферментные биосенсоры, в основу работы которых заложен иммуноферментный анализ.

В иммуноферментных биосенсорах для получения благочувствительной части (аналит) проводят, например, совместную иммобилизацию холинестеразы и антител против соответствующих антигенов на поверхность рабочего платинового (планарного) электрода. В качестве матричных компонентов используют бычий сывороточный альбумин, хитозан и нитрат целлюлозы для определения антигенов условно-патогенных микроорганизмов *Streptococcus pyogens* (пирогенного стрептококка) и *Staphylococcus aures* (золотистого стафилококка) [34].

Белки очень часто применяют как одну из составных частей аналита. Для определения иммуноглобулина G (lgG) в качестве чувствительного слоя используют композиционный материал на основе ионообменного для K^+ стекла с пленкой TiO_2 и белка А [35].

Для определения бактерий (антигенов) используют в качестве трансдьюсеров не только иммуноферментные электроды, но и такие устройства, как пьезокварцевые, оптические и др., на рабочие поверхности которых нанесены антитела или антигены.

Для детектирования антигена разработан иммуносенсор с микровесами на пьезоэлектрическом кристалле кварца с плотно упакованным на его поверхности семосборочным монослоем.

Для создания пьезоиммунного сенсора использован переменный одноцепочный фрагмент, ковалентно связанный с цистеином [36].

Иммобилизация антител *Esherichia coli* на электроде выполненного из индий-титан-оксида или на оцифрованном матричном микроэлектроде и на основе измерения полного сопротивления фарадеевского тока позволило такими биосенсорами детектировать кишечную палочку [37, 38].

В последнее время в качестве чувствительного элемента в биосенсорах используют рецепторы, бактериальные структуры, водоросли, тканевые фрагменты и др. Так используют гигантские клетки междоузлий клеток харовой водоросли *Nitella flexilis* для определения наличия примесей аммиака, присутствующего в микромолярных концентрациях в воде и различных реактивах [39]. В случае применения светящейся бактерии в качестве аналита, таких как *Photobacterium phosphoreum Sq3* и *Vibrio fischeri F1* позволяет по их биолюминесценции определять токсины [40]. Помимо клеток животного и растительного происхождения и бактерий в качестве аналита могут применяться и субклеточные структуры, например, митохондрии сердца быка, в биосенсорах для селективного контроля фенолов [41]. Фотоактивность цианобактерий, зависящая от их контакта с определенными соединениями, например с компонентами химического и биологического оружия – это свойство может быть реализовано при создании биораспознающих поверхностей [42]. Наиболее чувствительными к тяжелым металлам являются молекулы ДНК, что нашло им применение в биосенсорах [43]. Нуклеиновые кислоты представляют собой уникальный «инструмент» для создания биосенсоров вследствие многообразия механизма связывания белков и низкомолекулярных соединений. К ним относят электростатические взаимодействия с отрицательно заряженным фосфатным остовом, специфическое связывание с нуклеотидами вблизи поверхности спирали ДНК, включение низкомолекулярных соединений внутрь дуплекса между парами комплементарных оснований (интеркалирование). Основное внимание при создании ДНК-сенсоров уделяется изучению характеристик олигонуклеотидов, взаимодействующих с комлементарными нуклеотидными последовательностями (так называемым ДНК-зондом) на поверхнсоти преобразователя [18]. ДНК либо фрагменты олигодезоксинуклеотидов иммобилизуют на ртутно-пленочные или стеклоуглеродные электроды в составе нитроцеллюлозной матрицы [44]. В случае иммобилизации ДНК на поверхность серебряных электродов пьезоэлектрического кварцевого резонатора, оптимальным способом иммобилизации ДНК является сорбция на полиэтиленовый предшественник, что позволяет успешно использовать для определения в крови специфичных нуклеиновых кислот и антител в норме и при различных заболеваниях [45].

Аналиты на базе ДНК и ее ферментов используют для анализа химических и биохимических реакций. На основе окисления гуанина и аденина в молекуле ДНК судили о взаимодействии алкирующего агента 4,4’-дигидроксихалкона с односпиральной и двуспиральной ДНК, выделенной из тимуса теленка [46]. С помощью ДНК-электрохимического биосенсора изучали электрохимическое восстановление бензинидазола до производных гидроксилацина [47]. Для определения полифенолов для растительных экстрактов применяли двухкомпонентный аналит в биосенсоре на базе ДНК и фермента пероксидазы хрена иммобилизованных на $SiO_2 - TiO_2$ [19].

В настоящее время большую конкуренцию биосенсорам могут составить микрофлюидные чипы. Микрофлюидные чипы позволяют анализировать ДНК, РНК, белки и клетки. Основой микрочипа является микроаналитическая система, которая выполняет большое количество аналитических операций, включая подготовку, ввод и дозирование пробы, перемешивание, смешивание с реагентами, химические реакции, разделение полученного продукта, сбор фракций на заключительной стадии аналитических действий с пробой, детектирование. На микрофлюидном чипе регистрируют продукты анализа высокочувствительными системами детектирования (например, электрохимические, оптические, масс-спектрометрические и др., которые могут быть выполнены конструктивно отдельно или же быть интегрированы в чип, в том числе и биосенсор) [48].

Описано применение микрочипа, используемого при разделении ДНК, к определению снабженных флуорисцирующей меткой аминокислот, пептидов и белков [49].

Отмечается более высокая эффективность электрофоретического микрочипа для биоанализа почечных маркеров. В основу работы микрочипа положено сочетание ферментативных реакций на чипе креатина и креатинина с электрофоретическим разделением n-аминоглутаровых и мочевых кислот, обеспечивающих быстрые и одновременные измерения содержания основных почечных маркеров [50].

Чувствительность иммунологических чипов для детектирования антигенов вируса лихорадки Денге в 100 раз превышает достигнутую в традиционном сандвичевом твердофазном имунноферментном биосенсоре [51].

Таким образом, анализируя вышеизложенное, независимо от распознавания или типа, используемого в анализе для обеспечения селективности к определяемому веществу, существует общая черта для биосенсоров всех типов. Биораспознающий компонент иммобилизируют на поверхности преобразователя (трансдьюсера), где детектируется сигнал.

Создание биологической поверхности – сложный технологический процесс [52], так как при этом необходимо знать ее поверхностные свойства (структуру, реакционную способность, поверхностную энергию, смачиваемость и др.) [53]. Существует пять способов модификации (так называемые «растворимые») биологической поверхности:

1. пульверизация;
2. центрифугирование;
3. испарение капли раствора;
4. намазывание (накрашивание);
5. погружение в раствор модификатора.

Помимо этих, известны более сложные, чем «растворимые» способы модификации:

1. золь-гель метод;
2. вакуумное напыление;
3. метод Ленгмюра-Блоджет [54].

В свою очередь указанные способы подразделяются на две категории: захват и связывание. Иммобилизация биораспознащего компонента может происходить в один или два этапа. Биораспознающая молекула может присоединяться непосредственно к поверхности преобразователя [22] или модифицировать «несущий субстрат», который впоследствии, а иногда одновременно осаждается на преобразователь [44]. Физическая сорбция – наиболее простой вид иммобилизации. Одним из наиболее распространенных адсорбентов служит углерод [53, 11, 46, 17].

Весьма подходящей поверхностью для аналитов является полистирол [55]. Однако физическая адсорбция слабо удерживает реагент, который в результате быстро вымывается, поэтому его следует покрывать мембраной, проникаемой для определяемого вещества, и обладать способностью удерживать биораспознающие молекулы на поверхности преобразователя, кроме того, в некоторых биосенсорах применяют дополнительные мембраны для устранения помех со стороны легкоокисляемых соединений. Такие биосенсоры состоят из четырех составляющих: основного амперометрического датчика, ферментного слоя, защитной мембраны и окислительной мембраны, содержащей диспергированный нерастворимый окислитель (BaO_2, MnO_2, PbO_2 и др.) в полимерной матрице. Мешающие соединения устраняются посредством их окисления при прохождении через окислительные мембраны [56]. Иммобилизацию фермента аналитов производят и на природных протеиновых мембранах животного [13] и растительного происхождения [57]. Распространенным методом удерживания ферментов и живых клеток является поперечное сшивание, при котором образуется гелевая матрица, где частицы рецепторов удерживаются физически. Методы получения этого «геля» многочисленны [58].

Наиболее испытанный метод иммобилизации – поперечное сшивание с помощью глутарового альдегида [59]. Помимо глутарового альдегида существуют и другие, которые связываются преимущественно через группы NHO_2 – OH и SH. Это: дивинисульфон, диазобензидин, 4,4'-диазотиоцианато-дифенил-2,2'-дисульфокислота, N-сукцинимидил-4-малеимидобутират, фенол-2,4-бис(сульфонилхлорид), аминосоединения с длинной цепью, гексаметилендиазоцианат, n,n'-дифтор-m,m'-динитродифенилсульфон, диазобензидин-3,3'-дикарбоновая кислота, диметилилимидат, бисокапроны, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, N,N'-етиленбис (йодацетамид), 2,4-диизоцианотолуол, диазобензидин-3,3'-дианизидин, диабензидин-2,2-дисульфокислота, реагент К Вудворда, трихлортриазин, тиолы с длинной цепью [2].

Кроме указанных выше реагентов могут применяться и полимеры: желатин, агар, циклодекстрины, полипирол, полианилин и многие другие полимеры, фотополимеры и гели в качестве матриц для удерживания [9, 44, 22, 60, 61, 62].

Операционную стабильность аналита и стабильность при его хранении значительно увеличивают за счет дополнительного включения в матрицу полимеров желатина, предотвращающего инактивацию фермента, входящего в аналит в результате свободнорадикальных процессов, возникающих при детектировании фенольных соединений [9].

Для водных или содержащих воду реагентов важна также способность к гидратации, и для этих целей используют пленкообразующие эмульсионные полимеры, для которых pH, изотоничность и гидратационные характеристики можно подобрать в зависимости от конкретной биораспознающей системы [30, 63, 64].

В случае модификации поверхности трансдьюсера подложкой может служить либо сам преобразователь, либо полимерный материал, который будет нанесен на преобразователь в последующей операции. Не все преобразователи имеют подходящие связывающие группы на поверхности, и поэтому часто лучше обеспечить связь с материалом, который в последствии можно нанести на преобразователь. Этим материалом могут быть полимеры, например, сополимеры малеинового ангидрида, сополимеры метакриловой кислоты и др. Такие носители наносятся на преобразователь в виде тонкого слоя. Реакционные группы, к которым будет присоединяться биораспознающая молекула, можно образовать на полимере с помощью дериватизации мономера и сополимеризации, или с помощью прямой реакции с полимером.

При модификации очень важно иметь информацию о взаимной ориентации реагирующих молекул (катализатор – субстрат, фермент – ингибитор, антиген – антитело и др.) при протекании реакции. Для этих целей используют в биосенсорах метод поверхностного плазменного резонанса. Метод основан на взаимодействии поляризованного света с тонкой металлической пленкой (Au, Ag и др.), нанесенной на поверхность диэлектрика (стекло), которое модифицируется различными органическими и неорганическими веществами [65].

Проблема сохранения активности биологического материала на подложке решается путем применения жидких фотополимеризующихся композиций олигомерного и мономерного состава в качестве иммобилизованного матрикса.

В качестве таких материалов могут быть олигоуретанакрилат (ОУМ-1000Т и ОУМ-2000Т). Фотоинициатором служит 2-гидрокси-2-метил-1-фенилпропан-1-ОН. Для таких подложек применяют наиболее часто используемые в биосенсорах ферменты β-глюкозооксидазы, выделенной из Penicillium vitale [61, 62].

Примеры связывания различных реакционных групп на биораспознающей молекуле приведены на рис. 1.

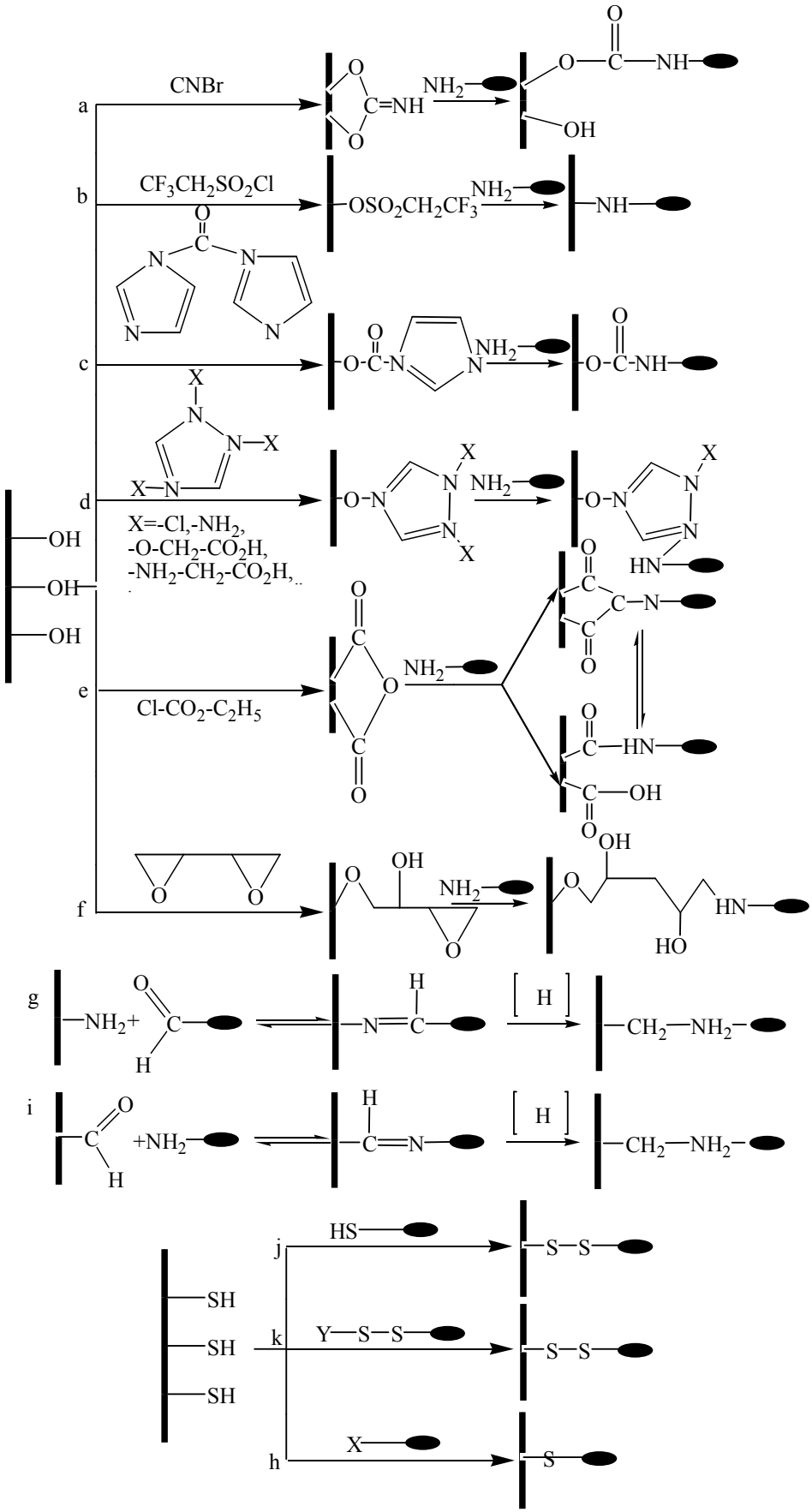

Рис. 1. Реакция звязывания различных реакционных груп
с биораспознающей молекулой

Многие другие поверхностные группы на подложке для иммобилизации перед ковалентным связывание должны быть функционализированы. Например, для функционализации поверхностных ОН–групп применяют силановые связывающие агенты типа X_3SiL или X_3SiR_2L, где X – гидролизуемая группа, а L – лиганд (или группа, которую можно превратить в лиганд); эти реагенты широко используют в случае применения кремнозема [19].

Термическая и гидролитическая стабильность очень высокая для таких типов носителей.

Про проектировании желаемой модификации поверхности возможны два подхода:

1. Связывающий агент присоединяется к носителю и затем реагирует с макромолекулой, которую нужно иммобилизовать (рис. 2).
2. Получают комплекс макромолекула-силан и затем осаждают прямо на поверхность.

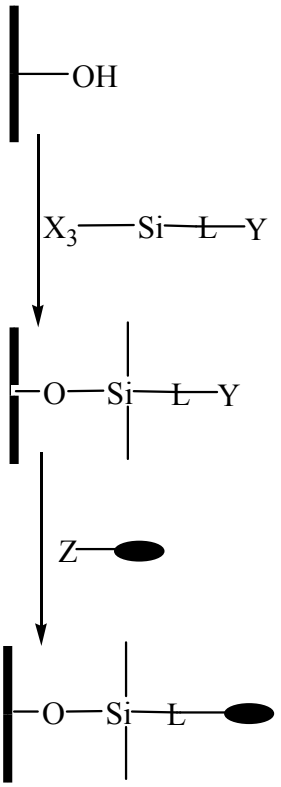

Рис. 2. Иммобилизация на поверхность, модифицированную силаном

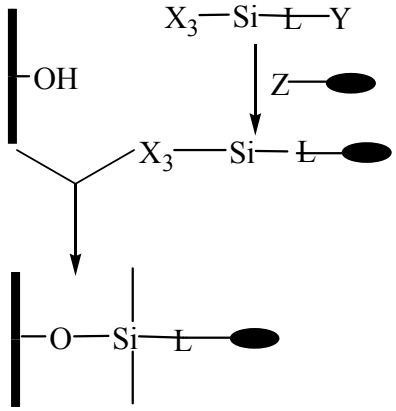

Рис. 3. Иммобилизация модифицированной силаном молекулы

Поверхностные ОН-группы часто используют в других реакциях связывания (рис. 1, а-е), помимо них можно использовать и другие группы, например, амидо– СООН и т.д. (рис. 3).

Приведем особенности процессов и механизмов взаимодействия макромолекулярного рецептора с лиганд-функционализированной поверхностью:

1. Молекулярное распознавание селективным центром рецептора, иммобилизованного аналога лиганда L. Межмолекулярные взаимодействия определяются комплементарностью распознающего центра рецептора и формой ван-дер-ваальсовой поверхности, зарядовым состоянием и доступностью тех или иных группировок в молекуле лиганда.

2. Пространственное блокирование лиганд-рецепторного взаимодействия в области контакта, обусловленное стерическими ограничениями процесса молекулярного распознавания рецептор-лиганд вследствие наличия дополнительных молекул лиганда в области контакта.

3. Подавление взаимодействия R-L в окрестности области контакта вследствие пространственного блокирования макромолекулярным рецептором иммобилизованных аналогов лиганда, находящихся в окрестности и непосредственно в области проекции рецептора на поверхность.

4. Стохастическая упаковка рецептора в двумерном слое на поверхности, приводящая к формированию полостей, размер которых меньше площади проекции R на поверхность [66].

На поверхности металлов, таких как из серебро, платина и золота [67, 22, 47, 68, 69, 17], особенно эффективным способом создания функциональных групп для иммобилизации является использование самоорганизующихся слоев [38], таких как из тиолов с длинной цепью, имеющие концевую группу для связи с распознающей молекулой [71].

Приведены конкретные примеры рецептуры иммобилизации некоторых аналитов. Рассмотрим этапы изготовления холинэстеразного биосенсора для определения фосфорорганических пестицидов [72]. Для создания холинэстеразного биосенсора использовали ацетилхолинэстеразу из электрического угря (АХЭ 3.1.1.7) с удельной активностью 463 Е/мг белка и бутилилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади (БуХЭ.КФ 3.1.1.8) с удельной активностью 580 Е/мг белка (Sigma Chemical Company, США) иммобилизацию проводили с присутствии бычьего сывороточного альбумина и нафиона (5 % эмульсия Aldrich, Германия). Субстратами АХЭ и БуХЭ служили ацетилхолин, ацетилтиохолинхлорид (Sigma Chemical Company, США).

Углеродные электроды модифицировали гетерогенными медиаторами электронного переноса – полианилином и ферроцианидом (III) (берлинской лазурью). При модификации электрода полианилином использовали два различных покрытия на основе полианилина. В первом случае (ПАНИ-х) полианилин синтезировали низкотемпературным окислением анилина персульфатом аммония, допировали камфорсульфоновой кислотой, смешивали с фенолом в соотношении 1:1 (масс.) и растворяли в хлороформе. Затем 5 мкл 0,15 % раствора ПАНИ-х наносили на поверхность электрода и высушивали при комнатной температуре. Второе покрытие (ПАНИ-э) получили электрополимеризацией анилина из серной кислоты на стеклоуглеродном электроде, предварительно обработанном 0,05 – 0,001 % нафионом (1 мкл/см^2 геометрической поверхнсоти). Электрополимеризацию проводили многократным циклированием потенциала электрода в диапазоне – 200…+ 1000 мВ при скорости развертки потенциала 40 мВ/с. Качество покрытия проверяли по pH-зависимости стационарного потенциала электрода, модифицированного полианилием.

Иммобилизация холинэстеразы. На электрод, покрытый полианилином, наносили 3 мкл смеси, содержащей 0,2 Е ацетилхолинэстеразы или 0,1 Е бутирилхолинэстеразы, 1 % альбумина, 1 % глутарового альдегида и 0,1 % нафиона, высушивали при комнатной температуре и промывали в растворе глицина для связывания непрореагировавшего глутарового альдегида. Холинэстеразные сенсоры хранили при 4 °С в рабочем фосфорном буферном растворе.

Для получения биочувствительной части (аналита) иммуноферментных сенсоров [73] проводили совместную иммобилизацию холинэстеразы и антител против соответствующих антигенов на поверхности рабочего электрода, выполненного из платиновой пасты. Из платины изготавливался вспомогательный электрод, из серебра – электрод сравнения. В качестве матричных компонентов для иммобилизации использовали бы-

чий сывороточный альбумин (БСА), хитазан и нитрат целлюлозы. При разработке иммуноферментного сенсора (ИФС) на основе бычьего сывороточного альбумина, содержащего раствор БСА, фосфатный буферный раствор (50 мМ pH 70) и дистиллированную воду вносили раствор фермента (бутирилхолинэстеразу активностью 29 АЕ/мг) и антитела (*Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*). Добавляли 1 % раствор глутарового альдегида. После энергичного перемешивания на поверхность рабочих электродов наносили по 1 мкл этой смеси.

Полученные иммуноферментные сенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при +4 °С. На следующий день сенсоры промывали водой, высушивали на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

ИФС с хитозаном в качестве носителя изготавливали следующим образом. Навеску хитозана растворяли в 1 % CH_3COOH , прибавляли 1 % раствор KOH, образовавшийся гель отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Затем гель снова растворяли в 1 % CH_3COOH . Раствор хитозана смешивали с необходимым биореагентом и иммобилизовали по описанному выше.

Для получения биочувствительной части ИФС на основе нитрата целлюлозы матричный компонент растворяли в смеси (1:1,6) толуола и бутилацетата, добавляли холинэстеразу, растворенную в дистиллированной воде, антитела в различных разведениях. После перемешивания добавляли глутаровый альдегид, тщательно перемешивали и иммобилизовали смесь биореагентов на поверхность рабочего электрода.

В работе использовали антигены (Аг) *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* и соответствующие антитела (Ат) против них. Методика получения включает механическое разрушение микробных клеток (дезинтеграцию), специфическую экстракцию с помощью боратного буферного раствора с pH 7,2 – 7,4, отделение неразрушившихся компонентов клеточной стенки, фильтрование и стандартизацию по белковому азоту. Поликлональные антитела получены методом ступенчатой иммунизации. Концентрации водных растворов Ат и Аг определяли спектрофотометрически при температуре 25 °С, при 280 и 260 нм.

Для *Staphylococcus aureus* исходная концентрация Ат = 0,995 $м^2$/мл, концентрация Аг = 1,1 $м^2$/мл. Для *Staphylococcus aureus* начальная концентрация Ат = 0,990 $м^2$/мл, Аг=1,263 $м^2$/мл.

Описанный иммуноферментный сенсор применяли для диагностики некоторых инфекционных заболеваний.

Таким образом следует, что наиболее важной проблемой является увеличение сроков эксплуатации аналитов в биосенсорах.

На наш взгляд, весьма перспективным является создание низкотемпературного банка аналитов, что было показано на примере митохондриевого биосенсора. Для этого типа биосенсоров отмечается хорошая воспроизводимость результатов. Митохондрии из сердца быка легко приготовить без необходимости применения стабилизатора, и они могут храниться в замороженном виде в течение нескольких месяцев [43].

ВЫВОДЫ

1. Разработка биосенсоров в настоящее время направленна на минитюризацию и снижение их стоимости, а также на обеспечение скрининг-анализа в полевых (экспедиционных) условиях. Выдвигают на первый план разработку как самих трансдьюсеров, так и аналитов.

2. Что касается трансдьюсеров, то здесь необходимо решить ряд аппаратных и математических задач, таких как математическая обработка измеренной информации, ис-

пользование методов распознавания образов («электронный нос», «электронный язык») и др.

3. Проблема применения аналитов в биосенсорах состоит в повышении воспроизводимости (регенерации) сенсорного слоя и стабильности его параметров (электрохимическая инертность) к реакциям восстановления и окисления, расширение диапазона определяемых концентраций, повышение чувствительности и селективность определяемых концентраций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eggins B. Himicheskie i biologicheskie sensory. – M.: Tehnosfera, 2005. – 336 p.
2. Kel'ner R., Merte Zh.-M., Otto M., Vidmer G.M. Analiticheskaya himiya. Problemy i podhody: v 2 h t.: Per. s angl. – M.: «Mir» OOO Izd vo AST, 2004. – V. 1. – 608 p.
3. Kel'ner R., Merte Zh.-M., Otto M., Vidmer G.M. Analiticheskaya himiya. Problemy i podhody: v 2 h t.: Per. s angl. – M.: «Mir» OOO Izd vo AST, 2004. – V. 2. – 728 p.
4. Stozhko N.Yu., Lipunova G.N., Maslakova T.N. Tolstoplenochnyj uglerod, soderzhaschiy elektrod, modifitsirovannyj formazanom dlya opredeleniya medi, svintsa, kadmiya i tsinka // Zhurnal analit. hi-mii. – 2004. – V. 59, N 2. – P. 202 – 208.
5. Hristov S.M., Boukoureshtieva R.I., Kaisheva A.R., Iliev I.D. Tyrosinase sensor for amperometric detection of plenol / Scientific Session of "Sofia Impedance Days", 2003 // Buld. Chem. Commun. – 2004. – 36, N 1. – P. 53 – 56.
6. Mailley P., Coming E.A., Mailley S.C. Composite carbon paste biosensor for phenolic derivatives based on in situ electrogenetated polyporrole binder // Anal. Chem. – 2003. – 75, N 20. – P. 5422 – 5428.
7. Liu A., Honma H., Zhou H. Electrochemical biosensor based on protein polysaccharide hybrid for selective detection of nanomolar dopamine metabolite of 3,4-dihydroxyphenylaceti acid (DOPAC) // Elecrochem Commun. – 2005. – 7, N 2. – P. 233 – 236.
8. Morozova O.V., Zaytseva E.A., Hadunina A.S. Amperometricheskie biosensory na osnove med'soderzhaschih oksidaz dlya opredeleniya fenol'nyh soedineniy // EMMA – 2004, 6 ya Vserossiyskaya konferentsiya po elektrohimicheskim metodam analiza s mezhdunarodnym uchastiem. – Ufa, 2004. – P. 71 – 73.
9. Yaropolov A.N., Shpeev S.V., Morozova O.V. Amperometricheskie biosensor dlya opredeleniya fenol'nyh soedineniy na osnove lokkazy, immobilizovannoy v polimernye matritsy // Zhurnal analit. himii. – 2005. – V. 60, N 6. – P. 624 – 628.
10. Cheng H. C., Abo M., Okubo A. Development of dimethyl sulfoxide biosensor using a mediator immobilized enzyme electrode // Analyst. – 2003. – 128, N 6. – P. 824 – 827.
11. Antiochia R., Lavagnini I., Magno F. Amperometric mediated carbon nanotube paste biosensor for fructose determination // Anal. Lett. – 2004. – 37, N 8. – P. 1657 – 1669.
12. Campruzano S., Loaiza O.A., Pedrero M., de Vilena F.J.M., Pinguarron J. M. An integrated benzyme glucose oxidase fructose dehydrogenase – tetrathiafulvabne – 3 mercaptopropionil acid-gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose Bioelectrochemistry. – 2004. – 63. N 1 – 2.
13. Adanyi N., Toth-Markus M., Szabo E.E., Varadi M., Sammartino M.P., Tomassetti M., Investigation of organic phase biosensor for measuring glucose in flow injection analysis system // Anal. chim. acta. – 2004. – 501, N 2. – P. 219 – 225.
14. Phanthong C., Somasundrum M.X. The steady state current at a microdisk biosensor // J. Electroanal. Chem. – 2003. – P. 558.
15. Koval'chuk E.P., Ostapovich B.B., Turik Z.L. Sintez doslidzhennya elektroprovidnih polimernih platform dlya biosensoriv // Ukr. him. zhurn. – 2006. – V. 72, N 11. – P. 21 – 36.
16. Yonzon C. R., Haynes C. L., Zhang X. Walsh J. T. Based on surface-cnhanced ramam scattring: Improved partition layer, temporal stability, reversibility and resistance to serum protein intereference // Anal. Chem. – 2004. – 75, N 1. – P. 78 – 85.
17. Chen H. J., Wang G., Zhang Q., Xia H. H., Chen H. Y. Third generation horseradish peroxidase biosensor based on self-assembling carbon nanotubes to gold electrode surface // Chin. Chem. Lett. – 2005. – 16, N 4. – P. 523 – 526.
18. Li Jian-Ping, Peng Tu-Zhi, He Xiao-Rong, Xiao Hai-Jun. Gaodeng xuexido huaxun xuebao // Chem. J. Chin. Univ. – 2003. – 24, N 3. – P. 404 – 409.
19. Budnikov G.K., Evstyugin G.A. Mikrokontsentrirovanie v sozdanii elektrohimicheskih sensorov i biosensorov v opredelenii organicheskih soedineniy // Ros. him. zhurnal. (Zhurn. ros. him. obschestva im. D.I. Mendeleeva). – 2005. – V. XLIX, N 2. – P. 22 – 25.

20. Mello L. D., Kubota L. T. HRP-based amperometric biosensor for the and fast evaluation of antioxidant capacity of vegetable extract // Int. Soc. Electrochem. – 2004. – P. 173.

21. Yang M., Li C., Yang Y., Shen G, Yu R. Huaxue xuebao // Acta china. Sin. – 2004. – 62, N 5. – P. 502 – 507.

22. Liu G., Lin Y., Ostatna V., Wang J. Enzyme nanoparticles-based electronic biosensor // Chem. Commun. – 2005. – N 28. – 3481 – 3483.

23. Zhang G., Wang Y. Fenxi huaxue Chin // J. Anal. Chem. – 31, N 12. – P. 1421 – 1424.

24. Gazaryan N.G., Gorton L., Ruzchas T. Peroksidaza tabaka – novyj reagent dlya amperometricheskih biosensorov // Zhurnal anal. himii. – 2005. – V. 60, N 6. – P. 629 – 638.

25. Chinowsky T., Naimushin A., Soelberg S., Spinelli X., Kauffman P., Yee S., Furlong C. Airborne surface plasmon resonance biosensung // Proc. SPIE. – 2004. – 5270. – P. 182 – 188.

26. Amine A., Pallschi G. Recent advance on biosensor based on enzyme inhibition // Congr. ISTISAH. – 2005. – N 3. – P. 21.

27. Nikol'skaya E.B., Evstyugin G.A., Shehovtsova T.N. Problemy i perspektivy primeneniya fermentov v analize obektov okruzhayuschey sredy // Zhurnal anal. himii. – 1994. – V. 49, N5. – P. 452 – 461.

28. Evstyugin G.A., Budnikov G.K., Ivanov A.A. Elektrohimicheskie biosensory na osnove grafitovyh elektrodov, modifitsirovannyh polianilinom dlya opredeleniya fosfororganicheskih pestitsidov // Ukr. him. zhurn. – 2005. – V. 71, N9. – P. 51 – 58.

29. Gwenin C.D., Keleji M, Willifms P.A, Jonas R.M. The development of a novel amperometric biosensor for the detection of nitro explosives // Soc. Electrochem. – 2004. – P. 360.

30. Singh S. Chenbey A. Malhotra B.D. Amperometrie cholesterol biosensor baset on immobilized cholesterol estecase and cholesterol oxidaze on conducting polypyrrole films // Anal.chem acta. – 2004. – 502, № 2. – P. 229 – 234.

31. Campanella L., Bellantoni D., Bonanni A. Comparison of different spectophotometric and fluotimetric methods and new biosensor or Voltammetric methods for measuring the antioxidant capacity of severel real matrices // Congr. ISTISAN. – 2003. – N 3. – P. 111.

32. Marshall A., Lowe C. R. Metabolite-sensitive holographia biosensor // Anal. Chem. – 2004. – N 5. – P. 1518 – 1523.

33. Zhou Guo-Jun, Zhang Gu O-Fang, Chen Hong-Yuan. Development of integrated chemiluminescence flow sensor for the determination of adrenaline and isoprenaline // Anal. Chim. acta. – 2002. – 463, N 2. – P. 257 – 263.

34. Presnova G.V. Biosensory na osnove immobilizovannoy peroksidazy dlya opredeleniya peroksida vodoroda: Avtoref. dis. kand. him. nauk. – M.: MGU im. M.V. Lomonosova, 2001. – 23 p.

35. Styuard M., Glin L. Affinnost' reaktsii antigen-antitelo i ee biologicheskoe znachenie. Struktura i funktsiya antitel: Per. s angl. – M.: Mir, 1983. – P.113 – 114.

36. Safina G.R. , Medyantseva E.P. , Folina O.G. Amperometricheskie immunofermentnye sensory dlya diagnostiki nekotoryh infektsionnyh zabolevaniy // Zhurnal analiticheskoy himii. – V. 60, N 6. – P. 616 – 621.

37. Yimit A. G., Huang X., Xu Y. Development of a composite optical waveguide sensor for immynoglobulin // Chem. Lett. – 2003.– 32, N 1. – P. 86 – 87.

38. Shen Z., Stryker G. A., Mernaugh R. Single-Chain fragment variable antibody piezoimmunosensor // Anal. Chem. – 2005. – 77, N 3. – P. 797 – 805.

39. Yang Liju, Li Yanbin, Erf Gisela F. Intenrdigitated array mierodec trodebased electrochemical impedance immunosensor for detection of Escherichia coli 0157:H7 // Anal. Chem. – 2004. – 76, N 4. – P. 1107 – 1113.

40. Ruan C., Yang L., Li Y. Immunobiosensor Chips for detection of Escherichia coli 0157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy // Anal. Chem. – 2002. – 74, N 18. – P. 4814 – 4820.

41. Kudryashov A.P., Yurin V.M. Opredelenie mikrokolichestv ammiaka v vode, aminokislotah i aminah po kolichestvennym pokazatelyam elektrofiziologicheskoy reaktsii kletok mezhdouzliy harovoy vodorosli Nitella Flexilis // Molekulyarno-biologicheskie i fiziko-himicheskie metody identifikatsii biologicheskih obektov i materialov razlichnogo proishozhdeniya. Materialy 2-y respublikanskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. – Minsk: Izd-vo RNVSh BGU. – 2003. – P. 56 – 60.

42. Katsev A.M., Goyster O.S., Starodub N.F. Vliyanie mikotoksina T 2 na intensivnost' biolyuminestsentsii bakteriy // Ukr. biohim. zhurn. – 2003. – V. 75, N 2. – P. 99 – 101.

43. Bragadin M., Gallo M., Grasso M., Manente S. The mitohondria from beer heart as biosensors for the selective monitoring of phenols // Ann. Chim. – 2003. – 93, N 4. – P. 373 – 379.

44. Pat. 6649417 SShA, MKI7 G 01 N 21/76, A N 09/819511. Tissue-based standoff biosensor for detecting chemical warfore agents / UT-Battelle, LLG Greenbaum E., Sanders G.; Zayavl. 28.03.01; Opubl. 18.11.03; NPK 436/172.

45. Babkina S.S., Uhalovich N.A., Moseeva E.N., Filyushina E.E. Kontsentrirovanie tyazhelyh metallov na immobilizirovannoy dezoksiribonukleinovoy kislote v sostave biosensora s tsel'yu ih opredeleniya v biologicheskih obektah // Zhurnal analiticheskoy himii. – 2003. – V. 58, N 7. – P. 731 – 732.

46. Babkina S.S., Palichek E., Yemen F., Foyta M. Elektrohimicheskie sensory na osnove statsionarnyh elektrodov i immobilizovannyh DNK libo ee fragmentov i otsenka ih analiticheskih vozmozhnostey // Zhurnal analit. himii. – 2005. – V. 60, N 6. – P. 639 – 645.

47. Konovalova O.A., Fahrullin R.F., Muhlissulina F. DNK modifitsirovannyj nanosensor na osnove p'ezokristallicheskogo kvartsevogo rezonatora: Sbornik statey // 7 ya Vserossiyskaya molodezhnaya nauchnaya shkola «Kogerentnaya optika i opticheskaya spektroskopiya». – Kazan': Izd-vo Kazan. un-ta, 2003. – P. 215 – 221.

48. Meric B., Kerman K., Ozkan D. Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4,4'-dihydroxy chalcone dased on guanine and adenine signals // J. Pharm. and Biomed. Anal. – 2002. – 30, N 4. – P. 1339 – 1346.

49. La-Scalea M.A., Serrano S.H.P., Ferreira E.I. Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrohemical biosensor // J. harm. and Biomed. Anal. – 2002. – 29, N 3. – P. 561 – 568.

50. Evstratov A.A., Bulyanitsa A.L., Kurochkin V.E. Ekspress-analiz oligonukleotidov na planernom mirofluidnom chipe // Zhurnal analit. himii. – 2004. – V. 59, N 6. – P. 587 – 594.

51. Dzyadevich S. V., Soldatkin O.P. Naukovi ta tehnologichni zasadi stvorennya miniatyurnih elektrohimichnih biosensoriv. – K. : Nauk. dumka, 2006. – 251 p.

52. Terner E., Karube I., Uilson Dzh. Biosensory: Osnovy i prilozheniya: per s angl. – M.: Mir, 1992 – 614 p.

53. Bidey S. P., Brodelius P., Kabral I. M. Immobilizovannye kletki i fermenty: Metody: kn. 1: per. s angl.– M.: Mir, 1988. – 215 p.

54. Lavrent'eva T.L. Issledovanie sorbtsionnoy sposobnosti pokrytiy p'ezokvartsevyh sensorov dlya opredeleniya letuchih fenolov i formal'degida: Avtoref. dis. kand. him. nauk. – Lipetsk: Lipetskiy gos. ped. un-t., 2001. – 20 p.

55. Ostrovskaya L.Yu., Perevertailo V.M., Matveeva L.A. Characterization of different carbon nanomaterials promising for biomedical and sensor application by the wetting method // Poroshkova matalurgiya. – 2003. – № 1 – 2. – P. 1 – 10.

56. Kalach A.V. P'ezosensory v monitoringe okruzhayuschey sredy // Ekologicheskie sistemy i pribory. – 2004. – N 10. – P. 8 – 10.

57. Kebets P.A., Nesterenko P.N. Primenenie sul'finirovannogo sverhsshitogo polistirola v ionnoy hromatografii // Zhurnal analiticheskoy himii. – 2003. – 58, N 7. – P. 720 – 721.

58. Choi S. H., Lee S. D., Ho S. J. Amperometric biosensors employing an insoluble oxidant as an interference-removing agent // Anal. chim. acta. – 2002. – 461, N 2. – P. 251 – 260.

59. Shang L., Liu X., Fan C., Li G. Anitric oxide biosensor based on horseradish peroxidase. Kieselguhr Co-modified pyrolytic graphite electrode // Ann. chim. – 2004. – 94, N 5 – 6. – P. 457 – 462.

60. Heo J., Thomas K. J., Seong G. H., Crooks R.M. A microfluidic bioreactor based on hydrogel-entrapped E. coli: cell viability, lysis and intracellular enzyme reaction // Anal. Chem. – 2003. – 75, N 1. – P. 22 – 26.

61. Wu Zai-Shen, Li Ji-Shan, Luo Ming-Hui. Gaodeng xuexio huaxuun xuebao // Chem. J. Chin. Unin. – 2005. – 26, N 3. – P. 441 – 445.

62. Rebriev A.V. Fermentniy sensor na osnovi fotopolimernih membran dlya viznachennya sechovini // Ukr. biohim. zhurn. – 2000. – V. 72, N 6. – P. 141 – 142.

63. Rebriev A.V. Podbor zhidkih fotopolimerizuyuschih kompozitsiy dlya immobilizatsii fermentov // Ukr. biohim. zhurn. – 2002. – V. 74, N 4. – P. 154 – 155.

64. Rebriev A.V., Starodub N.F., Masnyuk A.F. Zhidkie fotopolimerizuyuschiesya kompozitsii v kachestve immobilizatsionnogo matriksa biosensorov // Ukr. biohim. zhurn. – 2002. – V. 74, N 4. – P. 91 – 96.

65. Yamamoto K., Shi G., Zhou T. Solid-state pH ultramicrosensor based on a tungstic oxide film fabricated on a tungsten nanoelectrode and its application to the study of endothelial alls // Anal. Chim. acta. – 2003. – 480, N 1. – P. 109 – 117.

66. Marzouk Sayed A.M. Improved electrodeposited irdium oxide pH sensor fabricated on ethed titanium substrates // Anal. Chem. – 2003. – 75, N 6. – P. 1258 – 1266.

67. Boltovets P.N. , Verevka S.V., Dyachenko N.S. Orientatsiya proteinov na poverhnosti sensora i optimizatsiya ih immobilizatsii putem predvaritel'noy zaschity aktivnogo tsentra // Ukr. biohim. zhurn. – 2002. – V. 74, N 4. – P. 71 – 75.

68. Snopok B.A., Boltovets P.N., Rovell F.D. Vliyanie lokal'nogo okruzheniya i sostoyaniya immobilizovannogo liganda na protsess ego vzaimodeystviya s makromolekulyarnym retseptorom // Teoretich. i eksper. himiya. – 2006. – V. 42, N 4. – P. 210 – 216.

69. Medyantseva E.P., Safina G.R., Handeeva E.V. Ispol'zovanie amperometricheskih immunofermentnyh sensorov dlya opredeleniya bakterial'nyh antigenov // Zhurnal anal. himii. – 2004. – V. 59, N 2. – P. 109 – 197.

70. Skubal L.R., Meshkov N.K., Vogt M.C. Detection and identification of gaseous organics using TiO_2 sensor // J. Photochem and Photobiol A. – 2002. – 148, N 1 – 3. – P. 103 – 108.

71. Reekmans G., Campitelli A., Dehaen W., Maes G. Enhanced performance of an affinity biosensor interface baxed on mixed self-assemled monolayers // Langmuir. – 2003. – 19, N 10. – P. 4351 – 4357.

72. Evstyugin G.A., Budnikov G.K., Ivanov A.N. Elektrohimicheskie sensory na osnove grafitovyh elektrodov, modifitsirovannyh polianilinom dlya opredeleniya fosfororganicheskih pestitsidov // Ukr. him. zhurn. – 2005. – V. 71, N 9. – P. 51 – 59.

73. Safina G.R., Medyantseva E.P., Fomina O.G. Amperometricheskie imunnofermentnye sensory dlya diagnostiki nekotoryh infektsionnyh zabolevaniy // Zhurnal analit. himii. – 2005. – V. 60, N 6. – P. 616 – 623.