

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

*На правах рукописи*

**Пиденко Павел Сергеевич**

**Молекулярный импринтинг с использованием  
белковых молекул: создание сорбентов  
и их применение в иммуноанализе**

1.4.2. Аналитическая химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

**Научный руководитель:**

доктор химических наук, профессор  
Бурмистрова Наталия Анатольевна

Саратов 2023

Работа выполнена на кафедре общей и неорганической химии  
Института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный  
исследовательский государственный университет имени  
Н.Г. Чернышевского»

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Искусственные рецепторные системы .....	13
1.2 Молекулярно импринтированные полимеры.....	14
1.2.1 Полианилин в молекулярном импринтинге .....	15
1.2.2 Метод электроспиннинга в молекулярном импринтинге .....	21
1.3 Белковые молекулы как рецепторные элементы.....	24
1.3.1 Импринтированные белки .....	26
1.3.2 Влияние молекул шаблона на конформационные изменения белков.....	28
1.3.3 Стабилизация конформационных изменений .....	29
1.3.4 Очистка импринтированного белка от молекул шаблона.....	30
1.3.5 Аналитическое применение импринтированных белков.....	31
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	36
2.1 Оборудование и материалы.....	36
2.2 Методики и реагенты.....	40
2.2.1 Получение МИП ПАНИ.....	40
2.2.2 Методика определения ПХ с использованием ПАНИ МИП .....	42
2.2.3 Оценка селективности извлечения ПХ на ПАНИ МИП .....	43
2.2.4 Получение эпМИП .....	44
2.2.5 Методика определения ПХ с использованием ПУ и ПВП эпМИП .....	47
2.2.6 Проверка селективности извлечения ПХ на эпМИП .....	47
2.2.7 Получение ИБ .....	48
2.2.8 Синтез сорбента на основе НЧ SiO <sub>2</sub> , модифицированных ИБ .....	51
2.2.9 Методика синтеза конъюгатов для анализа с применением ИБ .....	52
2.2.10 Методика определения ЗЕА на основе импринтированных БСА и ГО.....	53
2.1.11. Проверка селективности ИБ .....	55
2.1.12. Методика определения Овальбумина с использованием анти-Овальбумин ИБ.....	56
2.1.13. Пробоподготовка образцов .....	57

2.1.14. Расчет аналитических характеристик .....	58
ГЛАВА 3. БИОИМПРИНТИГ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА В ПОЛИАНИЛИНЕ НА ПОВЕРХНОСТИ МУЛЬТИКАПИЛЯРОВ .....	59
3.1 Синтез ПАНИ МИП.....	60
3.1.1 Удерживающий слой ПАНИ.....	61
3.1.2 Получение ПАНИ МИП.....	63
3.2 Аналитические характеристики ПАНИ МИП.....	69
ГЛАВА 4. БИОИМПРИНТИГ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА В МАТЕРИАЛАХ ПОЛИУРЕТАНА И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИГА ....	74
4.1 Получение молекулярно импринтированных материалов на основе ПУ и ПВП, полученных методом электроспиннига .....	75
4.1.1 Получение материала из полиуретана .....	76
4.1.2 Получение материала из ПВП .....	81
4.2 Аналитические характеристики молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннига ПУ типа D4 и ПВП.....	83
ГЛАВА 5. ИМПРИНТИНГ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ .....	92
5.1. Молекулы шаблоны .....	93
5.2 Импринтинг белков.....	94
5.2.1 Выбор матричной белковой молекулы .....	95
5.2.2 Влияние концентрации молекулы шаблона при получении ИБ.....	99
5.2.4 Выбор метода получения .....	106
5.3 Аналитические характеристики ИБ, специфичных к ЗЕА .....	109
5.3.2 Импринтированный овальбумин.....	114
5.3.2 Импринтированная ГО .....	117
5.4 Аналитические характеристики ИБ, специфичных к высокомолекулярным молекулам шаблонам.....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	127

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

**МИП** – молекулярно импринтированный полимер

**ИБ** – импринтированный белок

**ПАНИ** – полианилин

**ПХ** – пероксидаза хрена

**ПУ** – полиуретан типа D4

**ПВП** – поливинилпироллидон

**эпМИП** – молекулярно импринтированные полимеры, на основе материалов полученных методом электропрядения

**ЗЕА** – зеараленон

**Микропланшет** – 96 луночный микротитровальный планшет

**НЧ SiO<sub>2</sub>** – наночастицы оксида кремния

**Овальбумин** – альбумин яичного белка

**ИК** – Инфракрасная спектроскопия

**ЖХ-МС/МС** – жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

**ВЭЖХ-УФ** – высокоэффективная жидкостная хроматография с абсорбционным детектором

**СЭМ** – сканирующая электронная микроскопия

**ДРС** – динамическое рассеивание света

**ПАНИ МИП** – молекулярно импринтированные полимеры на основе полианилина

**БСА** – бычий сывороточный альбумин

**ГО** – глюкозооксидаза

**4-ГК** – 4-гидроксикумарин

**НЧ** – наночастицы

**БД** – бидистиллированная вода

**ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub>** – наночастицы оксида кремния, модифицированные полианилином

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Одной из актуальных задач современной химии является разработка эффективных биомиметических систем молекулярного распознавания. На данный момент широко применяемой техникой получения искусственных рецепторных систем является молекулярный импринтинг. Полученные материалы – молекулярно импринтированные полимеры (**МИП**) – характеризуются наличием селективных сайтов связывания, специфичность которых определяется природой субстрата (молекулы шаблона), введенного при их получении. При этом одним из перспективных направлений является получение МИП, селективных к высокомолекулярным молекулам биологического происхождения – белкам (**биоимпринтинг**). Сложность белковой структуры и ее трансформация под действием различных физико-химических параметров (рН, температура и др.) накладывает определённые ограничения на условия проведения молекулярного биоимпринтинга. Актуальной задачей является разработка простого, быстрого и дешевого метода получения МИП, селективных к белкам.

В то же время уникальные свойства белковых молекул открывают возможность их применения и в качестве полимерной матрицы в молекулярном импринтинге. Такой тип молекулярного импринтинга (**биоимпринтинг**, **импринтинг белковых молекул**) широко применяется для получения импринтированных белков (**ИБ**), имитирующих каталитические свойства различных ферментов. В качестве рецепторных элементов при разработке аналитических систем ИБ впервые применены в 2016 году. Перспективным направлением является применение ИБ для разработки аналитических методов, позволяющих достигать аналитические характеристики, сопоставимые с коммерчески доступными иммунохимическими системами. При этом получение ИБ экономичнее иммунохимических реагентов и соответствует направлению «зеленой» химии и этическим требованиям. В то же время число аналитических систем на основе ИБ ограничено. Получение ИБ, характеризующихся

специфическим сродством к различным высоко- и низкомолекулярным молекулам шаблонам, и систематическое изучение влияния условий их получения на аналитические свойства, является практически значимой и актуальной задачей.

**Цель диссертационной работы** состояла в разработке методов получения МИП на основе синтетических и природных (белков) полимеров и их применении для определения низко- и высокомолекулярных соединений.

Для достижения поставленной цели решены следующие **задачи**:

- Получить МИП на основе полианилина (**ПАНИ**), специфичные к белковым молекулам, и разработать методику определения пероксидазы хрена (**ПХ**).
- Получить МИП, специфичные к белковым молекулам, на основе материалов из полиуретана **типа D4 (ПУ)** и поливинилпирролидона (**ПВП**), полученных методом электроспиннинга (**эпМИП**), разработать методику определения ПХ с использованием полученных МИП.
- Разработать подход для получения ИБ, специфичных к зеараленону (**ЗЕА**) и его структурным аналогам (4-гидроксикумарин, кумарин), разработать методику определения ЗЕА в конкурентном формате на микротитровальном планшете (**микропланшете**). Разработать методику получения сорбента специфичного к ЗЕА, на основе модификации наночастиц оксида кремния (**НЧ SiO<sub>2</sub>**) ИБ, оценить сорбционные характеристики сорбента.
- Разработать подход для получения ИБ, специфичных к альбумину яичного белка (**овальбумин**) и ПХ, разработать методику определения овальбумина в конкурентном формате на микропланшете.

**Методы исследования.** В работе для решения поставленных задач применены следующие физико-химические методы исследования: флуоресцентная, абсорбционная и Фурье-инфракрасная (**ИК**) спектроскопия, жидкостная (**ЖХ-МС/МС**) и высокоэффективная жидкостная хроматография (**ВЭЖХ-УФ**), оптическая и сканирующая электронная микроскопия (**СЭМ**),

метод динамического светорассеяния (ДРС), гель-электрофорез, эксклюзионная хроматография.

**Научная новизна исследования** состоит в следующем:

- Разработан двухстадийный метод получения МИП, специфичных к ПХ, на основе полианилина (**ПАНИ МИП**), иммобилизованных на поверхности стеклянных мультикапилляров. Предложена методика определения ПХ в модельных растворах с использованием ПАНИ МИП.
- Предложен подход к получению молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга ПУ и ПВП, специфичных к ПХ.
- Разработан подход к молекулярному импринтингу альбуминов (бычий сывороточный альбумин (**БСА**), овальбумин) и ферментов (глюкозооксидаза), специфичных к низко- (зеараленон – ЗЕА, 4-гидроксикумарин – 4-ГК, кумарин) и высокомолекулярным (овальбумин, ПХ) соединениям.
- Предложен подход к получению сорбента на основе НЧ  $\text{SiO}_2$ , модифицированных импринтированной глюкозооксидазой, специфичного к ЗЕА, и показана возможность его применения для твердофазной экстракции аналита из модельных растворов.

**Практическая значимость работы:** Результаты работы вносят вклад в развитие аналитических методов разделения и концентрирования на основе молекулярно импринтированных полимеров.

- Разработана и апробирована на модельных растворах методика определения ПХ с использованием мультикапилляров, модифицированных ПАНИ МИП.
- Показана возможность применения молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга ПУ и ПВП, для концентрирования ПХ с последующим спектрофотометрическим определением.
- Разработаны методики получения ИБ, специфичных к низкомолекулярным молекулам шаблонам (ЗЕА, 4-гидроксикумарин, кумарин), показана возможность применения 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля удаления молекул шаблона из белковой матрицы.

- Разработаны методики получения ИБ, специфичных к ЗЕА, и их иммобилизации на поверхности микропланшета и мультикапилляров, апробированные для определения ЗЕА в экстрактах пшеницы.
- Разработаны методики получения ИБ, специфичных к высокомолекулярным соединениям (овальбумин, ПХ). Предложен двухэтапный подход может способ очистки ИБ от молекул шаблонов белковой природы, включающий диализ и эксклюзионную хроматографию. Показана возможность применения полученных ИБ для определения овальбумина в экстрактах кондитерской продукции.
- Продемонстрирована возможность создания сорбента на основе ИБ и коммерческих НЧ SiO<sub>2</sub>, оценены его сорбционные характеристики и показана возможность применения для твердофазной экстракции ЗЕА на примере модельных растворов.

**На защиту автор выносит:**

1. Методику получения ПАНИ МИП, специфичного к белковым молекулам, на поверхности стеклянных мультикапилляров, и их применение для определения ПХ в модельных растворах.
2. Подход к получению МИП, специфичных к белковым молекулам, на основе материалов, полученных электроспиннингом ПУ и ПВП, и применение полученных импринтированных материалов для определения ПХ в модельных растворах.
3. Подход к получению ИБ, специфичных к низкомолекулярным молекулам шаблонам (ЗЕА, 4-ГК, кумарин), и их применение для определения ЗЕА в экстрактах пшеницы. Применение 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля процесса удаления молекул шаблона из белковой матрицы.
4. Подход к получению импринтированной глюкозооксидазы, специфичной к высокомолекулярным молекулам шаблонам (овальбумин, ПХ), и ее применение для определения овальбумина в экстрактах кондитерской продукции. Методика двухстадийной очистки ИБ от молекул шаблонов белковой природы.

**Личный вклад соискателя** заключался в постановке задач, а также выполнении основных теоретических и экспериментальных исследований: разработке методик получения и очистки МИП и материалов на их основе, разработке методик определения низко- и высокомолекулярных соединений в модельных смесях и реальных объектах, анализе и обобщении литературных и экспериментальных данных, оценке результатов исследований и формулировании выводов, представлении полученных результатов на всероссийских и международных конференциях, написании научных публикаций.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ в изданиях, входящих в перечень ВАК, библиографические базы данных Web of Science и Scopus, патент РФ и ряд материалов конференций.

Степень **достоверности результатов исследований** подтверждается применением современных физико-химических и аналитических методов исследования, соответствием между полученными результатами, а также отсутствием противоречий с литературными данными, апробацией полученных данных на всероссийских и международных конференциях, публикацией основных положений диссертационного исследования в профильных высокорейтинговых реферируемых журналах.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационного исследования были доложены на всероссийских и международных конференциях: "IV Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии» (Россия, Туапсе, 2023 г.), XIX Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Россия, Нальчик 2023), IV Съезд Аналитиков России (Россия, Москва, 2022), XVIII Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Россия, Нальчик 2022), XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Россия, Санкт-Петербург, 2019), II Всероссийская

конференция «Химия биологически активных веществ» с международным участием «ХимБиоАктив-2019» (Россия, Саратов, 2019).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения (3 главы), выводов и списка цитируемой литературы. В тексте содержатся таблицы, схемы, диаграммы и графические иллюстрации. Работа представлена на 138 страницах, включает 42 рисунка и 7 таблиц.

**Финансовая поддержка работы** осуществлялась в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований «Искусственные системы молекулярного узнавания биополимеров на основе 2D синтетических рецепторов» (№ 18-29-08033), гранта Российского научного фонда «Высокоселективные сорбенты на основе молекулярно импринтированных полимеров для решения задач животноводства и растениеводства» (№ 22-16-00102), гранта Министерства образования и науки РФ № 4.1063.2017/4.6 и стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-1690.2022.4).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Мониторинг и количественная оценка содержания биологически активных веществ различной природы является неотъемлемой частью современной медицинской практики, экологического и биохимического контроля. Выявление новых веществ – объектов контроля, а также необходимость быстрого определения их концентрации, предпочтительно без использования специализированного лабораторного оборудования, в сложных химических и физических условиях, обуславливает необходимость модификации существующих и широкодоступных тест-систем. Наряду с источником сигнала (меткой), ключевым компонентом высокочувствительных аналитических тест-систем является рецепторный элемент, обеспечивающий возможность специфического молекулярного распознавания и экстракции целевого объекта из анализируемой пробы. В настоящее время широко применяются тест-системы на основе природных рецепторных элементов (антитела, факторы транскрипции, миниатюрные белки и ферменты) [1]. В живых организмах такие элементы необходимы для осуществления процесса клеточной сигнализации и передачи информации как внутри, так и между клетками [2]. В широкой медицинской, аналитической и биохимической практике, при производстве и разработке тест-систем, среди природных рецепторных элементов наибольшее распространение получили белки класса иммуноглобулинов – антитела [3], выполняющие сигнальную роль при функционировании иммунной системы. Несмотря на неоспоримые преимущества иммунохимических тест-систем, принципиальные ограничения их применения в агрессивных условиях (рН, температура и др.), вызванные природой антител, делают актуальным разработку и совершенствование синтетических рецепторных систем.

Одними из разработанных искусственных рецепторов являются молекулярно импринтированные полимеры (МИП). Применение МИП в качестве рецепторных элементов позволяет проводить определение объектов

контроля в агрессивных условиях среды и эффективно заменить рецепторные элементы природного происхождения в существующих аналитических методах.

## 1.1 Искусственные рецепторные системы

Межмолекулярные взаимодействия представляют собой связывание двух или более химических соединений посредством нековалентных связей. При правильном использовании энергетических и стереохимических особенностей нековалентных межмолекулярных сил (водородных и гидрофобных связей, электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий) возникает возможность имитировать природные взаимодействия и создавать искусственные рецепторные системы, способные прочно и избирательно связывать целевые молекулы [4]. Синтетические рецепторные системы принято разделять на несколько классов (рис. 1).

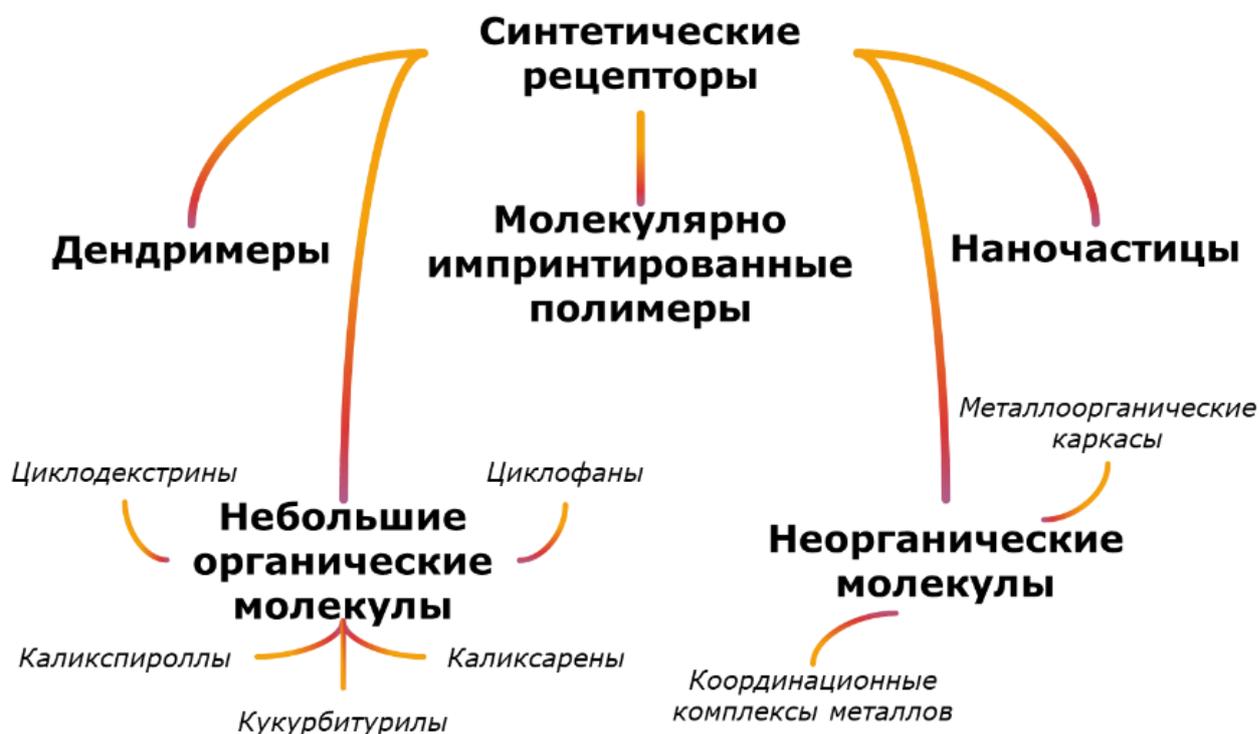


Рисунок 1. Классы синтетических рецепторных систем

Согласно [3,5,6], к синтетическим рецепторам относят синтетические олигомеры, небольшие органические молекулы, дендримеры, неорганические

молекулы и МИП. Для каждого класса синтетических рецепторов существует ряд собственных ограничений, например фундаментальные термодинамические факторы, вызывающие селективное нековалентное связывание. Кроме того, определение и обнаружение целевых молекул, как правило, проводят в водных средах, что накладывает ограничения, связанные с растворимостью, энергетическими затратами для дестабилизации сольватной оболочки и удаления молекул воды из сайтов связывания [5].

## 1.2 Молекулярно импринтированные полимеры

МИП, также известные как «молекулярно импринтированные синтетические антитела», в последнее время стали широко использоваться не только в их классическом приложении – специфичного сорбента, но также для решения различных задач биомедицины [7]. Сродство (аффинность) взаимодействия современных синтетических рецепторов находится на уровне сравнимом с антителами, а простые условия хранения и получения, обуславливают перспективность применения МИП в качестве рецепторного элемента для замены антител в иммуноанализе [8].

Молекулярный импринтинг является универсальным подходом создания сайтов специфического молекулярного распознавания в полимерных матрицах. Материалы, характеризующиеся способностью к повышенной адсорбции некоторых алкилбензолов впервые получены советским учёным Поляковым при полимеризации силикагеля в присутствии соответствующих углеводов [9]. Общая схема получения МИП включает образование комплекса между молекулой шаблона и функциональными мономерами посредством ковалентных или не ковалентных взаимодействий, и последующее удаление молекул шаблона из сформировавшейся полимерной сети. В результате получается структура, характеризующаяся наличием «молекулярной памяти» по отношению к молекулам шаблона [10,11]. Большое разнообразие мономеров и сополимеров открывает возможность регулировать морфологию и тип получаемых МИП(мембраны, плёнки, волокна, **НЧ**, частицы состава ядро–оболочка) [12] и

позволяет адаптировать метод получения МИП под решение конкретных задач иммуноанализа [13], аффинного разделения [14], сенсорики [15] и катализа [16]. Различают три различных технологии получения МИП - объёмный, поверхностный и эпитопный импринтинг [1]. Лимитирующей стадией любого метода получения МИП является процесс удаления молекулы шаблона. В связи с этим поверхностный формат получил наибольшее распространение в настоящее время.

Считается, что получение МИП, специфичных к высокомолекулярным объектам, в частности белкам, ввиду их природы, представляет определённую сложность [17,18]. В этом плане значительный интерес представляет возможность использования проводящих полимеров, для генерации полимерной сетки МИП. Сочетание электропроводных свойств и характеристик органических полимеров: низким весом, устойчивостью к коррозии, низкой стоимостью изготовления, возможность получения полимерной матрицы в мягких условиях [19], таких материалов, обуславливает большой интерес и перспективность их использования для получения МИП, специфичных к белковым молекулам.

### ***1.2.1 Полианилин в молекулярном импринтинге***

Среди различных проводящих полисопряженных полимеров наиболее изученным и наиболее интересным представителем является ПАНИ [20], характеризующийся простотой и вариативностью условий проведения синтеза, низкой стоимостью получения, высокой проводимостью и устойчивостью. Благодаря механизмам молекулярной самосборки ПАНИ часто образует надмолекулярные структуры с высокоразвитой поверхностью. К настоящему времени описано получение и свойства различных структур, синтезированных на основе ПАНИ: плёнки [21], гранулы [22], нановолокна [23], наносферы [24], микросферы [25], нанотрубки и нанопластинки [26]. Полианилиновые наноструктуры, обладают рядом преимуществ перед тонкими плёнками, а именно большой площадью поверхности и пористостью [27,28]. При этом

наноструктуры на основе ПАНИ способствуют иммобилизации на своей поверхности различных биокатализаторов и биорецепторов, что можно использовать для усиления аналитического отклика и, как следствие, чувствительности возможных сенсорных устройств [29]. Стоит обратить внимание на то, что применение ПАНИ при получении МИП не ограничивается только использованием в качестве матричного полимера. ПАНИ также используются для создания наноструктур и получения сорбирующих слоев для последующей иммобилизации или получения на них МИП. К настоящему времени известно значительное число МИП на основе ПАНИ, специфичных как к высоко- так и к низкомолекулярным целевым молекулам. Примеры таких работ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Применение ПАНИ в молекулярном импринтинге

Носитель 1	Молекула шаблона 2	Форма ПАНИ 3	Метод синтеза 4	Ссылка 5
Золотой электрод	Меламин	Плѐнка	Электрополимеризация	[30]
Золотой электрод	Хлорамфеникол	Нанопроволока	Электрополимеризация	[31]
Золотой электрод	Гистамин	Плѐнка	Электрополимеризация	[32]
Грефеновый электрод	Кардиотропонин	Плѐнка	Электрополимеризация	[33]
Стеклоуглеродный электрод	Меламин	Плѐнка	Электрополимеризация	[30]
Стеклоуглеродный электрод	Цефиксим <sup>®</sup>	Плѐнка	Электрополимеризация	[34]
Стеклоуглеродный электрод	Каликозин <sup>®</sup>	Нанопроволока	Электрополимеризация	[35]
Стеклоуглеродный электрод	Флукарбазон <sup>®</sup>	Плѐнка	Электрополимеризация	[36]
Магнитные НЧ на платиновом электроде	Дапсон <sup>®</sup>	Плѐнка	Электрополимеризация	[37]
Кварцевые преобразователи с золотым покрытием	Биотин	Плѐнка / нанопроволока	Электрополимеризация	[38]
Графеновый электрод	Диклофенак	Плѐнка	Электрополимеризация	[39]
Стеклоуглеродный электрод	Азитромицин <sup>®</sup>	Плѐнка	Электрополимеризация	[39]
Углеродные нанотрубки модифицированные НЧ CuO	$\beta$ -амилоид-42	Плѐнка	Электрополимеризация	[40]
Графитовый электрод	L-Аскорбиновая кислота	Плѐнка	Электрополимеризация	[41]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Стеклянный электрод	Алдикарб	Нанопроволока	Окислительная полимеризация	[42]
Золотой электрод	Хлорамфеникол (АБ)	Нанопроволока	Окислительная полимеризация	[43]
Фильтровальная бумага	Глюкоза	Плѐнка	Окислительная полимеризация	[44]
НЧ SiO <sub>2</sub>	Бензофенон-4	Стержневинные частицы	Окислительная полимеризация	[45]
Квантовые точки	Ломефлоксацин <sup>®</sup>	Плѐнка	Окислительная полимеризация	[46]
Углеродные нанотрубки	Адреналин	Плѐнка	Окислительная полимеризация	[47]
Электрод из оксида графена	П-Нитрофенол	Наночастицы	Окислительная полимеризация	[48]
Платиновый электрод	Фуранол	Наночастицы	Окислительная полимеризация	[49]
Стекло-углеродный электрод	Пероксидаза хрена	Нанопроволока	Окислительная полимеризация	[50]
Стеклянный электрод	Кварцетин	Нанокompозит	Окислительная полимеризация	[51]
Стеклоуглеродный электрод	Креатинин	Наночастицы	Окислительная полимеризация	[52]
Золотой электрод	Овальбумин	Наночастицы	Окислительная полимеризация	[53]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Золотой электрод	Парацетамол	Наночастицы	Окислительная полимеризация	[54]
Микроплашет	Пероксидаза хрена	Пленка	Окислительная полимеризация	[55]
	Альфа-фетопротеин			
Микрочастицы поли (глицидил метакрилата)	Пероксидаза хрена	Оболочка	Окислительная полимеризация	[56]
Магнитные НЧ	Витамин В12	Оболочка*	Окислительная полимеризация	[57]
Микроплашет	Трипсин	Пленка	Окислительная полимеризация	[58]
Магнитные НЧ	Трансферин	Оболочка*	Окислительная полимеризация	[59]
Мультикаппиляр	Пероксидаза хрена	Нанопроволока	Окислительная полимеризация	[19]

\* В качестве мономера использован 2-анилиноэтанол

Выбор метода полимеризации ПАНИ в основном зависит от природы молекулы шаблона. Так, для низкомолекулярных шаблонов, наибольшее распространение получила электрополимеризация анилина. В этом случае в качестве носителей МИП структур выступают электроды, позволяющие в полной мере реализовать очистку синтезированных сайтов за счет перезарядки поверхности ПАНИ МИП. С использованием полимеризации анилина под действием электрического тока, успешно разработаны методы получения ПАНИ МИП, специфичных к низкомолекулярным молекулы шаблонам различных групп, включая антибиотики, гормоны, инсектициды.

Большой интерес представляет применение ПАНИ МИП для создания рецепторного слоя на поверхности широко распространенных носителей, таких как микро- и наночастицы, пластиковые и стеклянные высокочувствительные оптические платформы, пластиковые и целлюлозные материалы. В большинстве случаев такие носители являются неэлектропроводными, что обуславливает необходимость применения окислительной полимеризации анилина, для получения ПАНИ МИП на их поверхности. Именно такой метод синтеза ПАНИ применяется при создании МИП, специфичных к белковым молекулам. Для повышения специфичности полученных сайтов связывания в большинстве случаев предлагается использовать технику ориентированного поверхностного импринтинга. В случае ориентированного импринтинга поверхность носителя предварительно модифицируется с использованием функционального мономера, обладающим высоким сродством к молекуле шаблону. В ряде работ [55,56,58,59] описаны методы получения ПАНИ МИП, специфичных к белкам. В качестве молекул шаблонов использованы гликопротеины, а в качестве функционального мономера авторами предложено применение производных бороновой кислоты, обладающих сродством к веществам содержащим *цис*-диольные фрагменты [55]. Несмотря на очевидные достоинства техники боронового ориентированного поверхностного импринтинга, ее применение ограничено структурными особенностями различных белковых молекул. Поэтому разработка универсального подхода получения ПАНИ МИП, специфичного к белковым

молекулам является актуальной задачей. При этом именно применение метода окислительной полимеризации, представляется перспективным для получения ПАНИ МИП, специфичных к белковым молекулам. Это обуславливается высокой производительностью метода, простотой синтеза, возможностью подбора окислителя и необходимой подложки с учетом поставленной задачи.

Однако методы синтеза МИП, специфичных к белковым молекулам с использованием электрических полей, так же представляют интерес, что обусловлено в первую очередь возможностью упрощения автоматизации процесса и достижения большей воспроизводимости аналитических характеристик импринтированного материала. Одним из перспективных и широко развивающихся электрохимических методов получения полимерных микро- и нановолокон является метод электропрядения/формования также известный как электроспиннинг [60].

### ***1.2.2 Метод электроспиннинга в молекулярном импринтинге***

Электроспиннинг — это простой, универсальный, экономически эффективный и легкодоступный метод производства микро- и нановолокон диаметром от десятков нанометров до микрометров [61]. Большинство синтетических и природных полимеров можно использовать для получения волокон методом электроспиннинга после растворения в соответствующих растворителях. В электроспиннинге для создания волокон используются только электростатические силы [62], основанные на приложении электрического напряжения к раствору или расплаву полимера [63]. Классическая установка для электроспиннинга изображена на рисунке 2 и включает в себя шприц (контейнер с раствором), на конце которого находится игла из нержавеющей стали или другого проводящего материала, насос, источник питания высокого напряжения и коллектор для сбора полученных волокон.

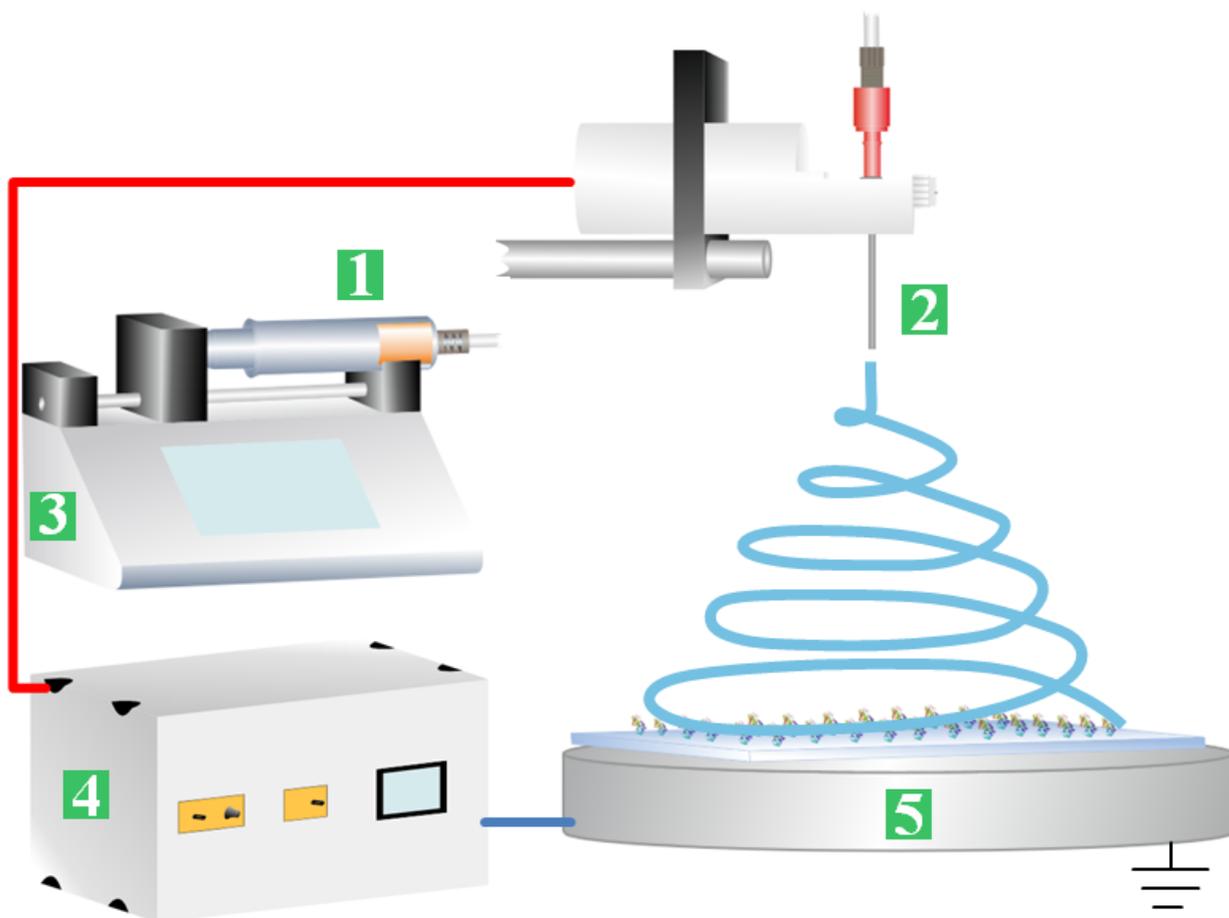


Рисунок 2. Установка для проведения электроспиннинга: шприц с полимером (1), игла (2), насос (3), источник питания высокого напряжения (4), коллектор (5)

В настоящее время существует три основных подхода для проведения молекулярного импринтинга волокон, полученных методом электроспиннинга:

- импринтинг при формировании волокон [64];
- молекулярный импринтинг поверхности волокон после завершения процесса электроспиннинга [65];
- твердофазный импринтинг [66,67]

Первые два подхода являются адаптацией классических методик получения МИП – объёмного и поверхностного импринтинга и, вероятнее всего, сложно применимы для получения МИП специфичных к белковым молекулам [68]. В случае импринтинга при формировании волокон, основным ограничителем выступает необходимость внесения белковых молекул в раствор полимера, для приготовления которого применяются органические

растворители, нарушающие исходную конформацию белка. Полученные сайты связывания в этом случае будут характеризоваться низким сродством к молекуле шаблону и, по-видимому, не позволят эффективно и специфично сорбировать белковые молекулы из анализируемых образцов. Кроме того, возможность эффективного удаления молекул шаблона из полимерной матрицы ограничена химической стойкостью волокон, как структурных элементов, полученного материала. При рассмотрении поверхностного импринтинга, по нашему мнению, основным ограничением так же является сложность удаления молекул шаблона без повреждения структуры волокон.

Большой интерес представляет так называемый иерархический импринтинг, впервые описанный в [64]. В этом случае волокна ПВП, полученные методом электроспиннинга, использовали в качестве носителя для целевой молекулы (БСА, бычий гемоглобин). Для получения импринтированных мембран на основе полиакриламида, специфичных к белкам, проводили иммобилизацию целых молекул на волокнах ПВП. Полученный материал характеризовался повышенной доступностью сайта связывания. Однако, несмотря на некоторые достоинства, предложенный подход не имеет дополнительных технологических преимуществ по сравнению с импринтингом при формировании волокон, и требует проведения дополнительной стадии разрушения волокон и молекул шаблонов при получении МИП мембран [68].

Твердофазный импринтинг [67], представляется наиболее эффективной стратегией получения МИП на основе волокон полученных методом электроспиннинга. Это обусловлено тем фактом, что такая техника позволяет сохранить нативную конформацию как белковой молекулы, без необходимости его перевода в органический растворитель, так и максимально сохранить исходные свойства (размер, форму и пористость) синтезированного волоконного материала. К особенностям техники твердофазного импринтинга также можно отнести применение в качестве подложки полидиметилсилоксановой матрицы, необходимой для получения из волоконного материала каркаса, имитирующего биологические ткани с формой, оптимальной для роста клеток. При применении

такого материала в качестве дополнительного рецепторного слоя в микропланшете для извлечения целевой молекулы необходимости в такой сложной форме волоконного материала нет. В связи с этим перспективным представляется замена полидиметилсилоксановой матрицы на подложку из планарного стекла.

К сожалению, селективность доступных и простых синтетических рецепторных систем не достигает селективности ферментов [16], а нерастворимые МИП не могут служить альтернативой природным рецепторам в ряде форматов иммуноанализа. Наиболее существенным недостатком МИП на основе синтетических полимеров является невозможность достижения необходимой гомогенности распределения сайтов связывания на поверхности материала. В связи с указанными недостатками существует необходимость поиска альтернативных подходов получения МИП. Перспективным направлением может являться выбор молекул белковой природы в качестве матричной молекулы для создания элементов распознавания и их модификация с применением технологии молекулярного импринтинга. Сочетание уникальных свойств белковых молекул и технологии формирования сайтов связывания в полимерной матрице позволяет создать высоко аффинные и селективные синтетические рецепторы на основе природных белковых молекул [6,69].

### **1.3 Белковые молекулы как рецепторные элементы**

Природные белковые системы (антитела, факторы транскрипции, миниатюрные белки и ферменты) способны выполнять функции рецепторов и обладают необходимыми свойствами для формирования систем молекулярного распознавания [1]. Белки характеризуются высокоорганизованной молекулярной структурой, сформированной упорядоченной укладкой аминокислотной последовательности, и, характеризующейся гибкой, чётко определенной трёхмерной конфигурацией, а также наличием структурных элементов — полостей и щелей, с большим набором функциональных групп, способных взаимодействовать с другими биополимерами, низкомолекулярными

молекулами и некоторыми видами поверхностей за счёт водородных связей, гидрофобных нековалентных взаимодействий или образования ионных пар [1]. Для изучения и выбора оптимальных белковых молекул для проведения импринтинга, необходимо рассмотреть основные структурные особенности и свойства природных белковых рецепторных систем.

*Антитела* имеют в своём составе переменную область, отвечающую за антигенсвязывающие свойства и включающую два одинаковых антигенсвязывающих участка [70], в зависимости от структуры и функций антитела подразделяют на пять классов. Антитела, как и другие белки, подвержены разнообразным физическим и химическим путям деградации. Нестабильность антител может наблюдаться в жидком, замороженном и лиофилизированном состоянии. Во многих случаях одновременно осуществляется несколько путей деградации и механизм деградации может меняться в зависимости от условий.

*Факторы транскрипции* способны «реагировать» на широкое разнообразие химических сигналов [71], но существование различных механизмов распознавания антагиста и активации промотора, а также чувствительность экспрессируемых генов, факторов транскрипции, их носителей — бактерий создаёт сложности при разработке рецепторов на новые вещества [72].

*Миниатюрные белки* [73,74] способны связывать белковые мишени с высокой степенью аффинности. Занимая промежуточное положение между пептидами и крупными белками миниатюрные белки объединяют их достоинства, включая возможность биомолекулярного распознавания и специфичность последовательности. Однако из-за небольшого размера области возможного применения миниатюрных белков ограничены [72]

*Ферменты* специфичны к определённым субстратам и реакциям, поэтому нашли применение в биосинтезе и в качестве аналитического инструмента [75]. Биосенсоры на основе ферментов являются [70], одними из самых популярных аналитических инструментов, появившихся за последние десятилетия, что объясняется большим количеством ферментативных реакций и возможностью

контроля за увеличением или ингибированием каталитической активности фермента при воздействии аналита [75]. К недостаткам использования ферментов в биосенсорных устройствах относят [76]: степень доступности активного сайта для субстрата, ограниченное время и количество циклов использования, возможность деактивации и ограничения стабильности во времени; влияние на ферментативную активность кислотности среды, ионной силы, температуры и химических ингибиторов.

Увеличение стабильности молекул белковой природы, возможность формирования и имитации сайтов связывания, а также сохранение сайтов связывания ферментов возможны при проведении импринтинга белков, представляющего альтернативный подход получения МИП, заключающийся в использовании молекул белковой природы вместо полимерной матрицы.

### ***1.3.1 Импринтированные белки***

Привлекательность использования молекул белковой природы, как матричной молекулы при проведении молекулярного импринтинга обуславливается набором уникальных структурных свойств белков, которые способствуют образованию комплексов белок–молекула шаблона [1,77]. При этом взаимодействие белков с молекулами шаблона сопровождается изменением конформации и проявлением кооперативных эффектов, за счёт которых система приобретает новые свойства, отсутствующие у отдельных компонентов [78].

Известно [79], что первой задокументированной попыткой формирования сайта связывания в белковой молекуле является цикл работ Полинга [80,81], посвящённый получению *in vitro* антител с необходимой специфичностью к антигенам — красителю метиленовому синему и полисахариду пневмококка III типа. Процесс создания искусственных антител включал несколько этапов: денатурация белковых молекул, вызывающая раскручивание концов цепи в присутствии антигена; последующее избавление от денатурирующих условий сопровождающееся ренатурацией цепей с образованием конформации, комплементарной антигену. В дальнейшем подобная техника модификации

белков (получения ИБ) адаптирована для усиления их ферментативной активности [82,83], предотвращения обратимой денатурации белков и потери свойств белковых молекул в процессе лиофильной сушки или осаждения [84,85] а также при создании систем селективного распознавания [86,87]

Современная техника импринтинга белков схожа с работами Полинга [80] и включает несколько основных и второстепенных этапов, представленных на рисунке 3, незначительно отличающихся у разных исследовательских групп:

- протонирование матричного белка;
- добавление молекул шаблона для образования новых молекулярных конфигураций;
- выведение системы из денатурирующих условий;
- фиксация получившейся конфигурации/конформации;
- удаление молекул шаблона из белковой матрицы.

Полученные ИБ отличаются от матричного белка наличием сайтов связывания, сформированных функциональными группами, способными к селективному взаимодействию с соединениями, аналогичными по строению молекулам шаблона [86,88]. Это позволяет рассматривать ИБ в качестве альтернативы моноклональным и поликлональным антителам в ряде форматов иммуноанализа, а также в качестве рецепторного элемента при создании специфичных сорбентов для твердофазной экстракции.

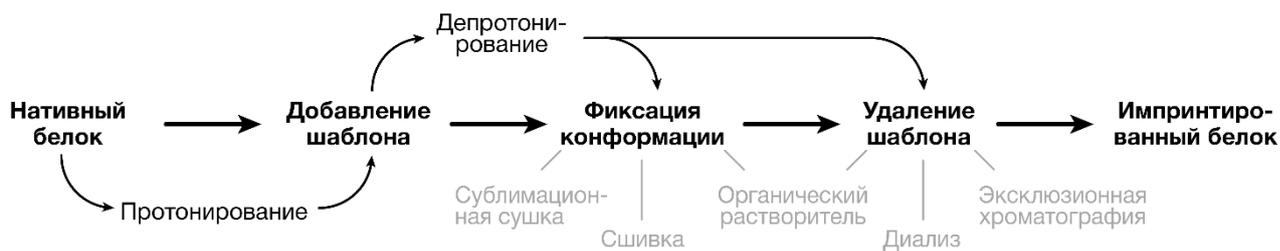


Рисунок 3. Основные этапы импринтинга белков

Растворение нативных белков и добавление молекул шаблона в основном проводят в водных средах [1]: непосредственно в воде [89], в буферных растворах с практически нейтральной кислотностью [84,90–92] или в условиях постепенного изменения кислотности водных растворов на этапе денатурации

[83–85]. Сообщается [93], что для некоторых систем кислотность и ионная сила раствора, содержащего нативные белки, связаны с эффективностью проведения импринтинга, оцениваемой по изменению ферментативной активности, а их влияние обусловлено воздействием ионных сил на получаемые сайты связывания.

### ***1.3.2 Влияние молекул шаблона на конформационные изменения белков***

При взаимодействии белка с молекулами шаблона происходит изменение локальной структуры белка в диапазоне конформационных микросостояний системы молекула шаблона–белок, доступных энергетически [94]. Считается [95], что этот факт обуславливает возможность аналогов молекул шаблона взаимодействовать только с определёнными малоразличимыми конформациями белка, подтверждая эффект структурной памяти. Наиболее распространёнными структурными изменениями считаются [96]: упорядочение участков полипептидной цепи относительно нативного белка, изменения относительного положения доменов в многодоменных белках, перемещения основной цепи, а также комбинации изменений. Однако, известна и альтернативная модель [97], для которой предполагается, что белок уже существует в ряде энергетически сходных конформаций, а молекула шаблона избирательно связывается с одной из этих конформаций, увеличивая долю этой конформации среди всех молекул белка.

Согласно экспериментальным данным, полученным Расселом и Клибановым [82], добавление молекул шаблона, являющихся конкурентным ингибитором, к раствору субтилизина с последующим проведением сублимационной сушки, увеличивает активность фермента в 100 раз. Позже аналогичные результаты получены для [98–100] миоглобина [101] и  $\alpha$ -химотрипсина [102], что подтверждает существование конформационных изменений в активных сайтах фермента при взаимодействии с молекулами шаблонами. Авторы связывают данный эффект с сохранением состояния ионизации в ионогенных группах белка в процессе помещения в безводный

растворитель. Подобная конформация исчезает при повторном растворении фермента в воде, что обусловлено переходом белковой молекулы к первоначальной термодинамически устойчивой конформации, вызывающей разрушение сайта связывания. В связи с этим, задача сохранения и стабилизации получающейся микроконформации, и, как следствие, сайта связывания, является наиболее приоритетной при получении ИБ, наряду с этапом удаления молекул шаблона.

### ***1.3.3 Стабилизация конформационных изменений***

Для стабилизации и сохранения получившейся конформации, в основном, используют три метода: сублимационную сушку [82–84], перемещение белковых молекул в безводные органические растворители [103,104], и добавление сшивающих мономеров [86,88,105,106].

Ранее [102] считалось, что ферменты и другие белки денатурируют, и, как следствие, теряют каталитическую активность в органических растворителях. В тоже время авторы [107] доказали, что это предположение неверно, и в абсолютизированных безводных средах ферменты обладают очень жёсткой структурой, сохраняющей приобретённую конформацию. Следовательно, при проведении импринтинга и переводе системы в безводный растворитель, происходит осаждение ИБ и «заморозка» переходного состояния комплекса матричная молекула–молекула шаблона, приводящая к формированию сайта связывания [92].

Несмотря на преимущества проведения ферментативных превращений с использованием ИБ в органических растворителях, применение белков и ферментов в основном ограничивается водными средами, являющимися наиболее распространёнными для многих ферментативных биохимических реакций и методов анализа. Ограничивающим фактором является склонность ферментов и белков к частичной денатурации и снижению жёсткости активного центра или приобретённого сайта связывания за счёт своей конформационной гибкости [108]. Сохранение свойств ИБ в водных растворах возможно при

проведении ковалентной стабилизации посредством внутрибелковых и межбелковых перекрёстных сшивок, осуществляемых после этапа ренатурации.

В работах, посвящённых получению ИБ, используется ограниченное число бифункциональных сшивающих мономеров: глутаровый альдегид (ГА) [86–88,109], диметакрилат этиленгликоля [90], триметилпропан триметилакрилат [110], *n*-бензохинон [92]. Концентрация сшивающего мономера, кислотность, массовое соотношение между сшивающим мономером и белком, а также время сшивки, влияют [109,111] на степень сшивки, а также на возможность образования агрегатов белковых молекул. ГА традиционно используют в качестве белкового сшивающего мономера [111], что связано с низкой стоимостью и коммерческой доступностью реактива. Ковалентные связи, созданные в процессе сшивки, устойчивы в растворах с высокой ионной силой, в условиях изменения кислотности и температуры, вследствие чего сшитые белковые структуры не подвергаются растворению или разрушению. При этом структура остаётся проницаемой для растворителей и растворённых веществ [112].

Стабилизация конформации не только «замораживает» структуру белка, но может приводить к включению молекул шаблона в белковую матрицу, поэтому следующим по важности этапом является удаление молекул шаблона.

#### ***1.3.4 Очистка импринтированного белка от молекул шаблона***

Основными способами удаления молекул шаблона из белковой матрицы, являются диализ [86,88,105], экстракция органическими растворителями [X,X], эксклюзионная хроматография [108] и сочетание диализа и эксклюзионной хроматографии [87]. При этом в большинстве публикаций, посвящённых получению ИБ, процессу удаления шаблонов не уделяется должного внимания, а определение остаточного количества молекул шаблона, как правило, полностью игнорируется. После проведения импринтинга, очистки и концентрирования ИБ, по-видимому, сохраняется первичная структура исходного белка. При этом наблюдается изменение вторичных и третичных

структур, перестройка внутрибелковых нековалентных сил: водородных связей, солевых мостиков и гидрофобных взаимодействий боковых цепей аминокислот, приводящих к формированию сайтов связывания. Изменения затрагивают также гидродинамический объём, значение изоэлектрической точки и биохимические свойства, например возможно приобретение каталитической активности, нехарактерной для нативных белков [1,88].

### ***1.3.5 Аналитическое применение импринтированных белков***

Работа, посвященная импринтингу овальбумина для придания ему ферментативных свойств глутатион-пероксидазы, представленная Lui в 2004 г. [88], может считаться предвестником современного применения ИБ как рецепторных элементов в аналитической химии [77]. Описанный подход, получил развитие для решения задач аналитической химии, начиная с 2016 г. [86], в том числе в работах нашей группы [87,105,113]. Аналитические характеристики разработанных систем представлены в таблице. 2.

Таблица 2. Рецепторные системы на основе импринтированных белковых молекул

Белок	Молекула-шаблон		Носитель	ПО, мкг/л	ДОС, мкг/л	Ссылка
Овальбумин	Афлатоксин В1		Золотой электрод	0.002	1–1000	[86]
БСА						
БСА	Зеараленон		Микропланшет	4	8–500	[105]
Овальбумин				н/д	н/д	
Гемоцианин из лимфы улитки				н/д	н/д	
БСА	Зеараленон		Микропланшет	5	10–290	[114]
	Дезоксиниваленол			35	55–420	
Овальбумин	Зеараленон		Поликапиллярные системы	0.12	1–8	[113]
Гликозилированный альбумин	Липосахариды	<i>E. coli</i>	Фотонный кристалл	0.87	н/д	[115]
		<i>P. aeruginosa</i>		1.22		
Овальбумин, Моноклональные антитела	Квакхурин		Микропланшет	4 мг/л	4.7–75.0 мг/л	[106]
			Микропланшет	0.8 мг/л	2.3–37.5 мг/л	
ГО	Овальбумин		Микропланшет	6	10–2000	[87]

\*ПО – предел обнаружения

\*\*ДОС – Диапазон определяемых содержаний

Импринтинг овальбумина для определения микотоксина афлатоксина В1 разработан Mattiason [86]. Получение импринтированного белка включало стадии: (1) обратимой денатурации в растворе HCl (pH 3.0, 10 мин), (2) импринтинга белка в присутствии молекул шаблона (10 мин), (3) ренатурации белка в щелочной среде (при добавлении NaOH до pH 8.0), (4) закрепления полученной структуры белковой молекулы в присутствии сшивающего мономера (глутаровый альдегид, 4°C, 12 ч). Молекулы шаблона удаляли из ИБ диализом против фосфатно-солевого буферного раствора (10 mM, pH 7.4, 48 ч). Полученный импринтированный овальбумин успешно использовали для сенсорного определения афлатоксина В1 методом циклической вольтамперометрии. Иммобилизацию ИБ проводили на золотом электроде, предварительно модифицированном самоорганизующимся монослоем альфа-липоевой кислоты и активированном N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом.

Определенный интерес в плане изучения возможностей ИБ в аналитической химии представляет работа [106]. Авторами проведено систематическое изучение влияния природы белка на свойства ИБ с использованием в качестве молекулы шаблона квакхурина. Установлено, что наилучшие сорбционные и аналитические характеристики достигаются при импринтинге моноклональных антител. Этот факт подтверждает концепцию Полинга по *in vitro* синтезу антител [80,81]. Возможность направленной смены специфичности моноклональных антител с учетом поставленной задачи является перспективным направлением современной биотехнологии. В то же время использование для импринтинга моноклональных антител приводит к увеличению стоимости рецепторного элемента.

По аналогии с получением МИП, специфичных к клеточным структурам, предложена оригинальная методика обнаружения грамотрицательных бактерий на основе импринтированного гликозилированного альбумина [115]. Липосахариды, выделенные из бактерий, использованы в качестве молекул-шаблонов, а фотонный кристалл на основе гидрогелей полистирола применен в

качестве носителя. Обнаружение бактерий основано на измерении изменения дифракционных характеристик фотонного кристалла.

Представленные работы демонстрируют возможность создания сенсорных элементов на основе ИБ с использованием протоколов, известных для иммунохимических методов анализа. Основным преимуществом ИБ является возможность получения рецепторного элемента на широкий круг целевых молекул, отказа от использования лабораторных животных и сложного оборудования. Немаловажной является также возможность существенного снижения себестоимости рутинного анализа по сравнению с иммунохимическими аналогами.

### *Заключения по главе 1*

Анализ литературных данных показывает, что МИП перспективны для замены природных рецепторных систем в ряде аналитических методов. Разработка методик получения МИП на основе ПАНИ, проявляющих специфичность к высокомолекулярным молекулам шаблонам – белкам, на основе ПАНИ, обладающего привлекательными синтетическими и электрохимическими характеристиками, а также изучение возможности применения метода гетерогенного импринтинга волокон, полученных методом электроспиннинга, для получения МИП, специфичных к белковым молекулам, являются актуальными задачами современной аналитической химии. Разработка методик получения ИБ, специфичных как к низкомолекулярным, так и высокомолекулярным молекулам шаблонам, для последующей замены антител в прямом конкурентном формате иммуноанализа, при анализе ряда аналитов является важной и актуальной задачей аналитической химии.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Оборудование и материалы

#### Оборудование

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV–1800» (Shimadzu, Япония), спектры флуоресценции растворов регистрировали на флуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies Inc., Австралия). Регистрацию спектров пропускания микроструктурных оптических волноводов (МОВ), проводили на оптической схеме с анализатором Avantes AvaSpec 2048 (Avantes BV, Нидерланды) в диапазоне 400–800 нм с шагом сканирования 0,5 нм и широкодиапазонного источника излучения ThorLabs (Thorlabs Inc., США) SLS261\М. Изменение интенсивности люминесценции квантовых точек проводили в гибридном многорежимном ридере Synergy H1 (BioTek Instruments, США), спектры поглощения в микропланшете регистрировали гибридным многорежимным ридером Sunrise (Tecan, Австрия). ИК-спектры плёнок ПАНИ на таблетке селенида цинка получали с использованием ИК-Фурье спектрометра Shimadzu IRAffinity–1S (Shimadzu, Япония). Измерение размеров белков осуществляли методом динамического рассеяния света (ДРС) с использованием комплекса оборудования для исследования характеристик дисперсных систем Zetasizer Advance Ultra (Malvern Panalytical, Великобритания). Для проведения электроспиннинга использовали установку производства Spraybase (Spraybase, США), состоящую из источника питания высокого напряжения, шкафа с климат-контролем и шприцевого насоса KDS Legato 180 (DKSH GmbH, Германия). Кислотность растворов, измеряли с помощью рН-метра AB33PH и электрода ST310 (Ohaus Co., США). Морфологию поверхности МИП

исследовали на сканирующем электронном микроскопе Tescan MIRA II LMU (Tescan, Чехия). Модификацию внутренней поверхности поликапиллярных структур проводили в проточном режиме с использованием ВТ 100-1F (Longer Pump, Китай). Для проведения электрофоретического разделения белков использовали камеру для вертикального электрофореза VE-10 (Helicon, Россия) и источник питания Эльф-4 (ДНК-технология, Россия). Количественную оценку результатов гель-электрофоретического разделения смеси белков проводили с помощью программного обеспечения Fiji (США). Математические расчеты проводили с использованием программного обеспечения Origin Pro 2022 (OriginLab Co., США).

### Материалы

Образцы поликапиллярных систем (мультикапилляры, микроструктурные оптические волноводы) любезно предоставлены ООО НПП «Наноструктурная Технология Стекла» (Саратов, Россия). Образцы изготовлены из стекла одинаковых марок по технологии [116]. Диализ ИБ осуществляли в диализных мешках с размером пор 10 кДа — Snake Skin 10 000 MWCO (Thermo Scientific Inc., США), разделение смеси для предварительной очистки осуществляли в гель-фильтрационных обессоливающих колонках PD-10 (GE Healthcare, Великобритания) и в гель-фильтрационной колонке (1.0 × 70 см) заполненной Sephadex™ G-75 (Merck, Германия), концентрирование проводили центрифугированием в ультрафильтрационных пробирках 30 000 MWCO (JET Bio-Filtration Co. Ltd., КНР). Для получения и оценки аналитических свойств ИБ использованы титровальные 96 луночные микропланшеты, сорбирующие (MaxiSorb) и не сорбирующие с высокой и низкой связывающей способностью) – Nunc (Дания).

Для проведения экспериментов использовали следующие буферные растворы:

- 1) Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (0,01 моль/л, рН 7,4) готовили из стандартизированных таблеток (Реахим, Россия) и использовали для очистки ПВП МИП, ПУ МИП, ИБ и приготовления растворов модельных растворов молекул шаблонов (ПХ, ЗЕА, Овальбумина).
- 2) Карбонатный буферный раствор (0,05 моль/л, рН 9,6) готовили из стандартизированных таблеток (Merck, Германия; Реахим, Россия) использовали для проведения иммобилизации ИБ при определении ЗЕА и овальбумина.
- 3) Цитратный буфер (ЦБ) (0,05 моль/л, рН 4.0) готовили из стандартизированных таблеток (Merck, Германия) и использовали при получении ИБ.
- 4) Блокирующие буферные растворы на основе ФСБ с добавлением: казеина 0,5–3% масс., сухого обезжиренного молока (1, 2, 3, 5% масс.) и БСА 0,5–3% масс. использовали для предотвращения неспецифической сорбции молекул шаблонов при проведении определения ПХ, ЗЕА и овальбумина.
- 5) Промывающий буферный раствор ФСБ-Твин 20 (ФСБТ, 0.05% масс.) применяли для вымывания избытков реагентов при определении ПХ, ЗЕА и овальбумина.

Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду (БД) с удельным сопротивлением  $\sim 18 \text{ МОм/см}^{-1}$ .

## Жидкостная хроматография

### *А) ЖХ МС/МС*

Анализ микотоксинов методом ЖХ МС/МС выполнен лабораторией анализа пищевых продуктов университета г. Гент (Гент, Бельгия). Для анализа использовали систему AWaters Acquity UPLC, соединенную с масс-спектрометром Quattro Premier XE (Waters, США), оснащенный интерфейсом для электрораспыления. Хроматографическое разделение осуществляли, используя колонку ZORBAX Eclipse XDB C18 (3.5 мм, 100 мм×4.6 мм) (Agilent Technologies, Бельгия). Предел количественного определения методом ЖХ МС/МС составляет 12 мкг/кг для ЗЕН в образцах пшеницы [105].

### *Б) ВЭЖХ УФ*

Определение ЗЕА проводили с использованием ВЭЖХ УФ (LC-20AD Shimadzu, Япония) на колонке Waters Spherisorb ODS2 C18 Column (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) (Waters, США), в режиме термостатирования (25 °С) со скоростью потока 1,0 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали раствор H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,1% водн.) и ацетонитрил в соотношении 60:40 об. %, элюирование осуществляли в изократическом режиме [117].

## Гель-электрофоретическое разделения белков

Электрофорез исследуемых образцов осуществляли в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия в качестве денатурирующего агента [118] при силе тока 30 мА в течение 90 мин. Концентрирующий и разделяющий гели содержали акриламид 6 и 15% об., соответственно. Непосредственно перед внесением в лунки образцы

подвергали кипячению на водяной бане (5 мин). Окрашивание белков проводили с помощью красителя Кумасси бриллиантового голубого R-250.

## 2.2 Методики и реагенты

### 2.2.1 Получение МИП ПАНИ

#### Синтез удерживающего слоя ПАНИ

##### *А) Модификация внутренней поверхности мультикапилляров*

Мультикапилляры (2 см) перед синтезом ПАНИ очищали БД в ультразвуковой ванне (15 мин) и просушивали в токе аргона. Образцы мультикапилляров закрепляли в шприце через силиконовый переходник.

Синтез ПАНИ осуществляли по методике [119]. Для полимеризации анилина свежеприготовленные растворы  $C_6H_8ClN$  (10 ммоль/л, 100 мкл) и  $(NH_4)_2S_2O_8$  (12,5 ммоль/л, 100 мкл) в  $HCl$  (0,2 моль/л) предварительно смешивали, соблюдая мольное соотношение  $C_6H_8ClN$  и  $(NH_4)_2S_2O_8 = 1,25$ . После чего реакционную смесь использовали для заполнения мультикапилляра. Модификацию внутренней поверхности мультикапилляра проводили при температуре 20 °С, в течение 1,5 минут. После удаления смеси образцы промывали раствором БД (6 мл). Раствор  $C_6H_8O_6$  (5,7 ммоль/л, 6 мл) использовали для удаления избытка  $(NH_4)_2S_2O_8$  в проточном режиме. После чего образцы промывали БД до достижения нейтрального рН и высушивали потоком атмосферного воздуха.

### *Б) Модификация поверхности предметного стекла*

Образец предметного стекла (625 мм<sup>2</sup>) разделяли на четыре части, перед синтезом ПАНИ помещали в ЗИП-пакет, заполненный БД, и устанавливали в ультразвуковую ванну (15 мин) для очистки, после чего высушивали в токе горячего воздуха (100 °С). Для полимеризации анилина свежеприготовленные растворы C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN (10 ммоль/л, 250 мкл) и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (12,5 ммоль/л, 250 мкл) в HCl (0,2 моль/л) предварительно смешивали. Получившуюся смесь пипеткой-дозатором (450 мкл) наносили на поверхность предметного стекла, до формирования капли. Модификацию проводили при температуре 20 °С, смесь выдерживали на поверхности предметного стекла (1,5 мин) и удаляли, после этого образец промывали БД (9 мл). Для удаления непрореагировавшего (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, предметное стекло погружали в раствор C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (5,7 ммоль/л), затем промывали БД до нейтральных значений рН и высушивали на атмосферном воздухе.

### *Получение ПАНИ МИП*

#### *А) Получение МИП на внутренней поверхности мультикапилляра*

Непосредственно перед получением МИП в раствор C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN (155 мкмоль/л, 10 мл) в HCl (0,6 ммоль/л) добавляли раствор ПХ (1 мг/мл, 50 мкл, ФСБ). Образец мультикапилляра присоединяли к шприцу (3 мл) через силиконовый переходник. Растворы C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN (155 мкмоль/л, 500 мкл) и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (175 мкмоль/л, 500 мкл) в HCl (0,6 ммоль/л) предварительно смешивали в шприце при мольном соотношении C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> = 1,12. Получение МИП проводили при температуре 20 °С, смесь выдерживали внутри мультикапилляра (30 мин) и удаляли. После этого образец промывали БД (6 мл), раствор C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (5,7 ммоль/л, 6 мл, 100 мкл/мин) прокачивали через

образец мультикапилляра для удаления белковых молекул из матрицы ПАНИ МИП. Затем образцы промывали БД до достижения нейтрального рН и высушивали потоком атмосферного воздуха.

#### *Б) Получение МИП на поверхности предметного стекла*

Аликвоту раствора ПХ (1 мг/мл, 50 мкл, ФСБ) вносили в раствор  $C_6H_8ClN$  (155 мкмоль/л, 10 мл) в  $HCl$  (0,6 ммоль/л) непосредственно перед получением МИП. Для синтеза МИП в полученный раствор добавляли раствор  $(NH_4)_2S_2O_8$  (175 мкмоль/л, 250 мкл) в  $HCl$  (0,6 ммоль/л). После перемешивания смесь наносили на поверхность первого слоя ПАНИ. Синтез МИП проводили при температуре 20 °С, смесь выдерживали на поверхности (30 мин) и удаляли, полученный образец промывали БД (9 мл). Для удаления белковых молекул из матрицы ПАНИ МИП предметное стекло погружали в раствор  $C_6H_8O_6$ . Затем образец промывали БД до нейтральных значений рН и высушивали на атмосферном воздухе.

Получение неимпринтированного полимера (НИП) проводили по той же методике без добавления молекулы шаблона в преполимеризованный раствор.

#### Реагенты

Гидрохлорид анилина ( $C_6H_8ClN$ ,  $\geq 99\%$ ); персульфат аммония ( $(NH_4)_2S_2O_8$ ,  $\geq 99\%$ ); ПХ (279 ед./мг) – Merck (Германия), аскорбиновая кислота ( $C_6H_8O_6$ ,  $\geq 99\%$ ) – Реахим (Россия).

#### **2.2.2 Методика определения ПХ с использованием ПАНИ МИП**

Образцы мультикапилляров и предметных стекол, модифицированных ПАНИ-МИП и НИП, использовали для извлечения и определения ПХ. Иммунизацию раствора ПХ (0,05–10 нг/мл, ФСБ) проводили в течение 15 минут, после чего удаляли неспецифически связанные молекулы ПХ

раствором ФСБТ (6 мл, 100 мкл/мин). Затем образцы сушили в токе аргона. Для определения молекул ПХ, извлеченных ПАНИ МИП, ТМБ инкубировали (10 мин), затем субстрат отбирали (250 мкл) в лунки микропланшета с заранее внесенным раствором  $H_2SO_4$  (0,5 % об., 50 мкл). Спектры поглощения субстрата регистрировали в диапазоне 300–500 нм. Значения оптической плотности при длине волны 450 нм в зависимости от концентрации ПХ использовали для построения градуировочной зависимости.

### Реагенты

ПХ (279 ед./мг), Хромогенный субстрат для ИФА на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) – Merck (Германия).

### **2.2.3 Оценка селективности извлечения ПХ на ПАНИ МИП**

Селективность ПАНИ МИП к овальбумину изучена на примере извлечения ПХ из растворов белковых смесей, содержащих ПХ и овальбумин. Образцы мультикапилляров модифицированных ПАНИ МИП, заполняли смесью ПХ:овальбумин с соотношением 2500:600 мкг/мл (ФСБ). Далее смесь инкубировали (15 мин) и проводили анализ образцов смеси до и после инкубации с использованием электрофоретического разделения в полиакриламидном геле додецилсульфата натрия.

Селективность ПАНИ МИП к ГО изучена на примере извлечения ПХ из растворов белковых смесей, содержащих ПХ и ГО. Образцы мультикапилляров модифицированных ПАНИ МИП, заполняли смесями ПХ: ГО с различными соотношениями 5:1000; 5:100; 5:10; 5:1 нг/мл (ФСБ). Смесь инкубировали (30 мин) после чего удаляли неспецифически связанные молекулы белков раствором ФСБТ (6 мл, 100 мкл/мин). Для определения ГО на поверхности мультикапилляров, модифицированных ПАНИ использовали

методику, основанную на уменьшении интенсивности флуоресценции раствора квантовых точек в глюкозе (1 М) [120].

### Реагенты

ГО из *Aspergillus niger* (Тип 7, 1000 ед./мг); овалбумин ( $\geq 98\%$ ); глюкоза (10 М) – Merck (Германия), квантовые точки [121] любезно предоставлены Дроздом Д.Д (СГУ им. Чернышевского Н.Г).

### **2.2.4 Получение эМИП**

#### *Модификация поверхности предметного стекла*

При проведении гетерогенного импринтинга в качестве носителя использовали предметное стекло, иммобилизацию белка проводили по стандартной методике [122]. Образец покровного стекла ( $625 \text{ мм}^2$ ) перед синтезом ПАНИ помещали в ЗИП-пакет, заполненный БД, и устанавливали в ультразвуковую ванну (15 мин) для проведения очистки, после чего высушивали током атмосферного воздуха. Носитель погружали в раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  (50:50 % об.) на 30 минут, после чего образец промывали БД до нейтральных значений рН и высушивали. На следующей стадии носитель погружали в раствор 3-аминопропил триметоксисилана (АПТЕС, 1 % об.,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) и инкубировали 30 минут, промывали  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (60 % об.), высушивали и выдерживали в муфельной печи (60 минут) при температуре  $60^\circ\text{C}$ . Активацию поверхности носителя проводили с помощью раствора ГА (1 % об.) в течении 30 минут, на заключительном этапе иммобилизовали ПХ на поверхности модифицированного носителя. Удаление избытка ГА и ПХ проводили промыванием ФСБ, после стадий активации и иммобилизации, соответственно.

## *Процедура электроспиннинга*

Образец предметного стекла с иммобилизованными молекулами шаблона устанавливали на коллектор установки (рис. 2).

### *А) Получение эМИП на основе ПУ*

Для синтеза волокон методом электроспиннинга использовали раствор ПУ (14 % масс.) в смеси ДМФА/ТГФ (50:50 % об.). Раствор полимера загружали в стеклянный шприц (5 мл), тефлоновой трубкой соединяли со стальной иглой подачи (0,5 мм внутренний диаметр; 0,9 мм внешний диаметр). После чего шприц устанавливали в шприцевой насос, а иглу поднимали (20 см) и устанавливали по центру коллектора, с использованием трех координатных подвижек. Процесс электроспиннинга проводили при напряжении 8.9 кВ, при относительной влажности 35%, со скоростью подачи полимера 0,5 мкл/мин. Полученные волокна выдерживали в вакууме (24 ч) при температуре 20°C.

### *Б) Получение эМИП на основе ПВП*

Для синтеза волокон раствор ПВП (13 % масс.) в смеси ДМФА/С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН (50:50 % об.) загружали в стеклянный шприц (5 мл), тефлоновым капилляром соединяли со стальной иглой подачи (0,5 мм внутренний диаметр; 0,8 мм внешний диаметр). После чего шприц устанавливали в шприцевой насос, а иглу поднимали (20 см) и устанавливали по центру коллектора, с использованием трех координатных подвижек. Процесс электроспиннинга проводили при напряжении 13.3 кВ, при относительной влажности 31%, со скоростью подачи полимера 10 мкл/мин. Полученные волокна выдерживали в муфельной печи (4 ч) при температуре 175 °С, отделяли от поверхности носителя и хранили в эксикаторе.

Получение эпНИП проводили аналогично, с использованием носителя немодифицированного молекулами шаблона.

### *Приготовление матов эпМИП*

#### *А) Маты ПУ эпМИП*

Образец предметного стекла, покрытый структурами ПУ, погружали в БД. Фрагмент блокированной фильтровальной бумаги (БСА 4 % масс., ФСБ) закрепляли на внешней поверхности структуры ПУ эпМИП, а края материала, закрепляли на внутренней поверхности фрагмента фильтровальной бумаги. Затем проводили отделение полимерной сетки от поверхности предметного стекла, полученный мат выдерживали в вакууме (24 ч) при температуре 20°C. Для вырезания фрагментов мата с геометрическими параметрами лунки микропланшета использовали пресс.

#### *Б) Маты ПВП эпМИП*

На внешнюю поверхность мата волокон ПВП эпМИП закрепляли фрагмент блокированной фильтровальной бумаги (БСА 4 % масс., ФСБ). Для вырезания фрагментов мата с геометрическими параметрами лунки микропланшета использовали пресс.

### Реагенты

ПУ – Prospector (Германия); ПВП (360 кДа); диметилформамид (ДМФА,  $\geq 99\%$ ); тетрагидрофуран (ТГФ,  $\geq 99,9\%$ ) – Merck (Германия)

### ***2.2.5 Методика определения ПХ с использованием ПУ и ПВП эпМИП***

Заранее приготовленные фрагменты матов эпМИП, устанавливали в лунки микропланшета и фиксировали с помощью силиконового клея. Лунки микропланшета с закреплёнными фрагментами эпМИП (далее микропланшет с эпМИП) промывали раствором ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка) и проводили блокировку поверхности (БСА, 1 % масс., ФСБ) с последующим удалением избытка блокирующего буфера (ФСБТ, 3х, 300 мкл/лунка). Микропланшет с эпМИП использовали для извлечения и определения ПХ. Иммунизацию ПХ (1–10,000 нг/мл, ФСБ) проводили в течение 60 минут при 37°C, после чего удаляли неспецифически связанные молекулы ПХ раствором ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка). Для спектрофотометрического определения ПХ использовали ТМБ. После инкубации (250 мкл/лунка, 10 мин) субстрата, реакцию останавливали раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 % масс., 50 мкл/лунка). Спектры поглощения окисленного ТМБ регистрировали в диапазоне 300–500 нм, градуировочную зависимость строили при длине волны 450 нм от концентрации ПХ.

#### **Реагенты**

ПХ (279 ед./мг), ТМБ – Merck (Германия)

### ***2.2.6 Проверка селективности извлечения ПХ на эпМИП***

Селективность эпМИП к овальбумину и БСА изучена на примере извлечения ПХ из растворов белковых смесей, содержащих ПХ и овальбумин/БСА с различными соотношениями 1:0; 1:0,1; 1:10; 1:100; 1:1000 нг/мл (ФСБ). Смеси белков иммобилизировали (60 мин) в микропланшете с эпМИП, удаляли неспецифически связанные молекулы белков раствором

ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка) и проводили спектрофотометрическое определение ПХ на поверхности эпМИП с помощью ТМБ.

### Реагенты

Овальбумин ( $\geq 98\%$ ); БСА ( $\geq 98\%$ ); ПХ (279 ед./мг), ТМБ – Merck (Германия)

### **2.2.7 Получение ИБ**

#### *Получение ИБ, специфичных ЗЕА на основе БСА*

##### *А) Импринтинг белка в «пробирке»*

Получение ИБ на основе БСА, специфичных к ЗЕА проводили по оптимизированной методике [105]. Раствор БСА (1 мг/мл, ЦБ) выдерживали (10 мин) при перемешивании (20°C), титровали HCl (0,1 моль/л) до достижения pH = 3, перемешивали (10 мин), вносили ЗЕА (0,1 мл; 120 мкг/мл) и перемешивали в течении 15 минут. Титровали NaOH (0,1 моль/л) до достижения pH 8,0 и добавляли водный раствор ГА (1 % об.), перемешивали (30 мин) при 4°C и оставляли на 18 часов без перемешивания для завершения импринтинга.

Получение нИБ проводили аналогично, за исключением стадии добавления молекулы шаблона. Очистку полученных ИБ и нИБ от молекул шаблона и низкомолекулярных примесей проводили методом диализа против ФСБ в течение 48 часов (объем диализата 2 л, смена каждые 4 ч). Полученные образцы хранили в стеклянных виалах из темного стекла при 4°C.

##### *Б) in-situ на поверхности микропланшета*

Раствор БСА (1 мг/мл, ЦБ) вносили в лунки микропланшета (100 мкл/лунку), добавляли HCl (0,1 моль/л) до достижения pH 3. Микропланшет устанавливали в инкубатор с перемешиванием на 10 минут, после чего в лунки

добавляли ЗЕА (12 мкг/лунку) и перемешивали (10 мин), вносили NaOH (0,1 моль/л) до pH 8,0 и добавляли водный раствор ГА (1 % об., 10 мкл/лунку). Полученный раствор перемешивали (30 мин) при 4 °С и оставляли на 18 часов без перемешивания для завершения процедуры импринтинга. Очистку полученных *in-situ* ИБ и НИБ, проводили ФСБ (300 мкл/лунку).

Получение неимпринтированных белков (НИБ) проводили по аналогичной методике, без внесения молекул шаблона.

#### *Получение ИБ, специфичных ЗЕА на основе овальбумина*

##### *А) Импринтинг белка в «пробирке»*

Получение ИБ на основе овальбумина, специфичных к ЗЕА проводили по методике аналогичной импринтингу БСА. Очистку полученных ИБ и НИБ от молекул шаблона и низкомолекулярных примесей проводили методом диализа против ФСБ в течение 72 часов (объем диализата 2 л, смена каждые 4 ч). Полученные образцы хранили в стеклянных виалах из темного стекла при 4 °С.

##### *Б) in-situ в поликапиллярных системах*

Перед проведением *in-situ* получения ИБ, внутреннюю поверхность поликапиллярных систем, модифицировали поли-L-лизинном (0.1 % об., БД) по стандартной методике [123–125]. Затем в проточном режиме в образцы поликапиллярных систем последовательно вносили растворы овальбумина (1 мг/мл, ЦБ), HCl (pH = 3), ЗЕА (150 мкг/мл, ФСБ), NaOH (pH = 8). Каждый этап проходил в течение 10 минут, со скоростью подачи 2 и 25 мкл/мл для образца МОВ и мультикапилляра, соответственно. На заключительном этапе образцы поликапиллярных систем заполняли водным раствором ГА (1 % об.) и

оставляли в вертикальном положении на 18 часов до завершения процесса импринтинга.

Получение неимпринтированных белков (НИБ) проводили по аналогичной методике, без внесения молекул шаблона. Очистку полученных ИБ и НИБ от молекул шаблона и низкомолекулярных примесей проводили динамической десорбцией (ФСБ) со скоростью потока 300 мкл/мин в течение 72 часов.

#### *Получение ИБ, специфичных ЗЕА на основе ГО*

Получение ИБ на основе ГО, специфичных к ЗЕА проводили по методике аналогичной импринтингу БСА, с незначительными изменениями. В качестве молекул шаблонов кроме ЗЕА применяли его структурные аналоги (кумарин, 4-ГК). Фиксирование конформации ИБ с использованием ГА проводили при рН 9. Очистку полученных ИБ и НИБ от молекул шаблона и низкомолекулярных примесей проводили диализом против фосфатного буферного раствора (0,1 моль/л, рН 6,5) в течение 6 часов (400 мл/час), затем против ФСБ в течение 18 часов. Концентрирование растворов ИБ и НИБ осуществляли центрифугированием в ультрафильтрационных пробирках (3000 g, 4 °С, 7 мин). Полученные образцы хранили в стеклянных виалах из тёмного стекла при 4 °С. Получение неимпринтированных белков (НИБ) проводили по аналогичной методике, вместо раствора молекул шаблона вносили аналогичный объём  $C_2H_5OH$ .

#### *Получение ИБ, специфичных к овалбумину и ПХ на основе ГО*

Процесс импринтинга, проводили по методике аналогичной импринтингу БСА с некоторыми изменениями. Раствор ГО (1 мл, 15 мкмоль/л, БД) выдерживали (10 мин, 37 °С) при перемешивании, титровали HCl

(0,1 моль/л) до достижения рН 3, инкубировали (60 мин; 37 °С), раствор молекул шаблона — овальбумин и ПХ (0,1 мл; 0,2 мг/мл) и оставляли при перемешивании в инкубаторе (60 мин, 37 °С). Титровали смесь NaOH (0,1 моль/л) до достижения рН 9,0 и вносили водный раствор ГА (0,1 мл, 1 % об.), для фиксации полученной структуры. Завершение процесса импринтинга происходило в течение 18 часов при 4 °С. Очистку ИБ от молекул шаблона проводили диализом против ФСБ в течение 3 ч, с заменой диализата каждые 60 мин. Смесь после диализа вносили в эксклюзионную колонку (1.0 × 70 см, Sephadex™ G-75) для разделения матричных молекул и молекул шаблона. Компоненты смеси элюировали и фракционировали порциями раствора ФСБ (1 мл). Фракции, содержащие ГО без молекул шаблона, объединяли и концентрировали центрифугированием (3000 g, 4 °С, 7 мин). Полученные образцы хранили в стеклянных виалах из тёмного стекла при 4 °С.

### Реагенты

ЗЕА (≥99,9%); 4-ГК (≥98%), кумарин (≥98%); овальбумин (≥98%); БСА (≥98%); гемоцианин из лимфы улитки (≥98%); ГО из *Aspergillus niger* (Тип 7, 1000 ед./мг); ГА (≥98%); поли-L-лизин (водн. 5 % об., 150–300 кДа); наполнитель Sephadex™ G-75 (Superfine) – Merck (Германия), диализные мешки (10 кДа) — Snake Skin 10 000 MWCO (Thermo Scientific Inc.).

### **2.2.8 Синтез сорбента на основе НЧ SiO<sub>2</sub>, модифицированных ИБ**

Наночастицы SiO<sub>2</sub> (50 мг) диспергировали в растворе C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN (10 мл, 0,01 М HCl, рН 4) с использованием ультразвуковой обработки в течение 10 минут. В полученный раствор при постоянном перемешивании (4 ч, 0 °С) по каплям вносили (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (0,2 мл; 0,05 М), раствор выдерживали 12 часов. Модифицированные ПАНИ частицы оксида кремния (ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub>)

осаждали центрифугированием (5000 g, 15 мин), промывали БД для удаления непрореагировавших компонентов и сушили в вакууме (50 °С, 24 ч). ИБ иммобилизовали на поверхности частиц (5 мг) SiO<sub>2</sub> и ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub> методом физической адсорбции по ранее известным методикам [126–128]. Частицы, модифицированные ИБ, осаждали центрифугированием (5000 g, 5 мин), добавляли раствор ИБ и хранили в стеклянных виалах из тёмного стекла при 4 °С.

### Реагенты

Гидрохлорид анилина (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN, ≥ 99%); персульфат аммония ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, ≥ 99%) – Merck (Дармштадт, Германия), наночастицы Аэросил™ 200 (Evonik GmbH, Германия)

### **2.2.9 Методика синтеза конъюгатов для анализа с применением ИБ**

#### *Синтез конъюгата Овальбумин-ПХ*

Конъюгат овальбумин–ПХ синтезировали модифицированным периодатным методом [129]. Раствор ПХ (1 мл, 1 мг/мл) смешивали с раствором периодата натрия (10 мкл, 100 мМ) и перемешивали в темноте при 20 °С. Реакцию окисления останавливали добавлением сульфата натрия (20 мкл) и инкубировали в тех же условиях. Затем активированный фермент очищали диализом против карбонатного буферного раствора в течение 2 часов. Раствор овальбумина (500 мкл, 1 мг/мл) добавляли к активированному ферменту и смесь перемешивали на орбитальной мешалке в течение 2 часов при 20 °С. Для восстановления иминовых связей добавляли свежеприготовленный раствор тетрагидробората натрия (1 мкл, 0,5 моль/л) и выдерживали в течение 30 минут. После чего добавляли раствор этаноламина (30 мкл, 100 ммоль/л) для блокирования альдегидных групп. Смесь снова

инкубировали в течение 30 мин и очищали от низкомолекулярных веществ диализом против ФСБ в течение 1 часа. Для удаления несвязанных белков использовали гель-фильтрационную колонку ( $1.0 \times 70$  см, Sephadex™ G-75) с ФСБ в качестве подвижной фазы.

### *Синтез конъюгата Овальбумин-ФИТЦ*

Конъюгацию овальбумина с ФИТЦ проводили на основе методик [129,130]. ФИТЦ (5 мг) растворяли в 2,5 мл карбонатного буферного раствора и добавляли овальбумин (25 мг). Смесь перемешивали при 4 °С в темноте 18 часов. Смесь очищали диализом против ФСБ в течение 1 часа. Для очистки конъюгата использовали гель-фильтрационную колонку PD-10 и ФСБ в качестве подвижной фазы.

### Реагенты

ФИТЦ (Изомер I); ПХ (Тип VI, 250–330 ед./мг); овальбумин ( $\geq 98\%$ ) – Merck (Дармштадт, Германия), периодат натрия ( $\text{NaIO}_4$ ,  $\geq 99\%$ ) сульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\geq 99\%$ ) тетрагидроборат натрия ( $\text{NaBH}_4$ ,  $\geq 99\%$ ), этаноламин ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ ,  $\geq 99\%$ ) – Реахим (Россия).

### **2.2.10      *Методика определения ЗЕА на основе импринтированных БСА и ГО***

#### *Определение ЗЕА в микропланшете*

Раствор ИБ (1/10, 100 мкл/лунка, карбонатный буферный раствор), инкубировали при 37 °С и перемешивании в течение 30 минут, после чего промывали раствором ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка). Каждую лунку блокировали ФСБ, содержащим казеин (0,75 % масс., 200 мкл/лунка) в течение 1 часа при 37 °С и перемешивании, затем промывали раствором ФСБТ (3х,

300 мкл/лунка). В каждую лунку вносили растворы ЗЕА (50 мкл/лунка) и добавляли конъюгат ЗЕА–ПХ (50 мкл/лунка), после чего инкубировали в течение 1 часа при 37 °С и перемешивании. Лунки микропланшета промывали ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка), и добавляли в каждую лунку ФСБ (100 мкл), ТМБ (150 мкл), после появления окраски хромогенную реакцию останавливали внесением серной кислоты (5 % об., 50 мкл). Образцы субстрата спектрофотометрически анализировали в диапазоне 300–500 нм. Полученные данные использованы для построения зависимости оптической плотности при 450 нм от концентрации ПХ.

Для *in-situ* ИБ в микропланшете, методика определения ЗЕА аналогична за исключением стадии иммобилизации рецепторного элемента.

#### *Определение ЗЕА в мультикапилляре*

Раствор ИБ (1/10, 100 мкл/лунка, карбонатный буферный раствор), инкубировали при 37 °С внутри мультикапилляра в течение 1 часа. Затем, проводили блокировку внутренней поверхности мультикапилляра (ФСБ с добавлением казеина 0,75 % масс., 30 мин) в проточном режиме (50 мкл/мин) с последующей промывкой ФСБТ (30 мин, 200 мкл/мин). После чего мультикапилляр заполняли смесью ЗЕА:ЗЕА-ПХ (50:50 об.) и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Далее образцы мультикапилляра промывали ФСБТ (30 мин, 200 мкл/мин), заполняли ТМБ и инкубировали 10 минут. Раствор ТМБ (~150 мкл) собирали в лунки микропланшета, с внесенным заранее раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 % об., 50 мкл). Образцы субстрата спектрофотометрически анализировали в диапазоне 300–500 нм. По полученным данным строили зависимость оптической плотности при  $\lambda=450$  нм от концентрации ПХ.

Для *in-situ* импринтинга белка в мультикапилляре, методика определения ЗЕА, аналогична за исключением стадии иммобилизации ИБ.

## *Извлечение ЗЕА сорбентом модифицированным ИБ, специфичным к ЗЕА*

Сорбенты (НЧ SiO<sub>2</sub> и ПАНИ@SiO<sub>2</sub>) вносили в раствор ЗЕА (1 мл, 50 мкг/мл, ФСБ) и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 30 минут (50 об/мин). Концентрацию ЗЕА в надосадочной жидкости определяли методом ВЭЖХ-УФ после осаждения частиц центрифугированием (5000 g, 5 мин).

### Реагенты

ЗЕА ( $\geq 99,9\%$ ), БСА ( $\geq 98\%$ ); казеин, натриевая соль из молока коровы ( $\geq 80\%$ ); сухое обезжиренное молоко, герметизирующие пленки для микропланшета; ТМБ – Merck (Дармштадт, Германия), Конъюгаты ЗЕА и дезоксиниваленола с ПХ (ЗЕА-ПХ и ДОН-ПХ) получены Белоглазовой Н.В. (Университет г. Гент, Гент, Бельгия) [105].

### **2.1.11. Проверка селективности ИБ**

Для оценки селективности ИБ, на основе БСА и овальбумина проводили инкубацию (3ч, 20 °С) микотоксинов на предварительно модифицированную ИБ поверхность микропланшета. После чего растворы отбирали из микропланшета и проводили определение концентрации с использованием ЖХ МС/МС. Степень извлечения рассчитывали, как разность концентрации вещества в растворе до и после инкубации.

### Реагенты

Охратоксин А ( $\geq 99,0\%$ ), афлатоксин В ( $\geq 99,0\%$ ), фумонизин ( $\geq 99,0\%$ ),  $\beta$ -зеараленол ( $\geq 99,0\%$ ),  $\alpha$ -зеараленол ( $\geq 99,0\%$ ), зеараланон ( $\geq 99,0\%$ )– Sigma-Aldrich (Бельгия)

### **2.1.12.      *Методика определения Овальбумина с использованием анти-Овальбумин ИБ***

Раствор ИБ (1/10, 100 мкл/лунка, карбонатный буферный раствор), вносили в лунки микропланшета и инкубировали при перемешивании в течение 2 часов при 37 °С. После иммобилизации ИБ, лунки микропланшета промывали раствором ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка). Проводили блокировку поверхности в течение 1 часа при перемешивании с использованием раствора ФСБ, содержавшего казеин (0,75 % об., 200 мкл/лунка) при 37 °С. Промывали лунки микропланшета раствором ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка). Вносили овальбумин в различных концентрациях (50 мкл/лунка), добавляли конъюгат овальбумин–ФИТЦ (50 мкл/лунка) и инкубировали при перемешивании в течение 1 часа при 37 °С. Лунки микропланшета промывали ФСБТ (3х, 300 мкл/лунка), и добавляли в лунку ФСБ (100 мкл), перемешивали в течение 10 мин. Регистрировали интенсивность люминесценции при длине волны возбуждения 480 нм на длине волны испускания 520 нм. По полученным данным строили зависимость интенсивности люминесценции на 520 нм от концентрации овальбумина.

#### *Реагенты*

Овальбумин ( $\geq 98\%$ ); БСА ( $\geq 98\%$ ); казеин из молока коровы, натриевая соль ( $\geq 80\%$ ), герметизирующие пленки для МТП; – Sigma-Aldrich (Борнем, Бельгия)

### **2.1.13. Пробоподготовка образцов**

Разработанные методики апробированы на образцах злаковых культур, выращенных в Фламандском регионе (Бельгия) и Саратовской области (Россия), образцах кондитерской продукции, приобретенных в магазинах г. Саратова (Россия).

#### *Пробоподготовка образцов зерновых культур*

Для приготовления образцов зерновых культур навеску молотого зерна (1 г) экстрагировали в 5 мл смеси метанол / вода (70:30) в течение 15 минут на горизонтальном шейкере при комнатной температуре. Полученный раствор центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут, надосадочную жидкость разводили в четыре раза ФСБ (конечное разведение составляло 1/20)

#### *Пробоподготовка кондитерских изделий*

Образец кекса, не содержащего яиц, перемешивали в однородную смесь, отбирали 100 мг и добавляли к ним 1 мл ФСБ, выдерживали 1 ч при постоянном перемешивании, после чего смесь центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин и отбирали надосадочную жидкость. Надосадочную жидкость разбавляли 1 к 100 раствором ФСБ и добавляли различные концентрации ОВА: 20, 100, 500 нг/мл.

#### 2.1.14. *Расчет аналитических характеристик*

- Предел обнаружения (ПО) рассчитывали, как отношение трехкратного стандартного отклонения ( $3\sigma$ ) к наклону калибровочной кривой  $S$  для низких концентраций:  $ПО = 3\sigma/S$ . [131].
- Линейный динамический диапазон – интервал концентраций от порога чувствительности до концентрации с заметным отклонением от прямой пропорциональности ( $\geq 3-5\%$ ) [132].
- Для выражения воспроизводимости результатов анализа рассчитывали относительное стандартное отклонение ( $Sr$ ), которое представляет собой отношение стандартного отклонения выборки  $S$  к среднему значению  $\bar{x}$ :  
$$Sr = \frac{S}{\bar{x}} [133].$$
- Для выражения специфичности полученных МИП рассчитывали Импринтинг фактор (ИФ) – отношение аналитического сигнала на МИП, к аналогичному сигналу на НИП [134].
- Степень извлечения, оценивали как отношение аналитического сигнала аналита до и после извлечения на носители, модифицированные МИП [105].

### **ГЛАВА 3. БИОИМПРИНТИГ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА В ПОЛИАНИЛИНЕ НА ПОВЕРХНОСТИ МУЛЬТИКАПИЛЛЯРОВ**

МИП – один из видов синтетических рецепторных систем в последнее время широко применяется не только для получения специфических сорбентов, но и в качестве рецепторного элемента в различных методах анализа [7]. Применение в качестве полимерной матрицы электропроводящих полимеров, в том числе ПАНИ [30,55], является одним из перспективных направлений развития современного молекулярного импринтинга. Для синтеза ПАНИ при получении МИП применяют методы окислительной и электро- полимеризации [30,48]. Среди методов получения ПАНИ МИП, специфичных к белковым молекулам, наибольшее широко применяется метод окислительной полимеризации. К преимуществам можно отнести: скорость получения полимерного покрытия, возможность тонкой настройки синтеза для получение надмолекулярных структур ПАНИ с необходимыми параметрами, а также возможность модификации поверхности носителей, материал которых не проводит электрический ток (стеклянных, полимерный и др.).

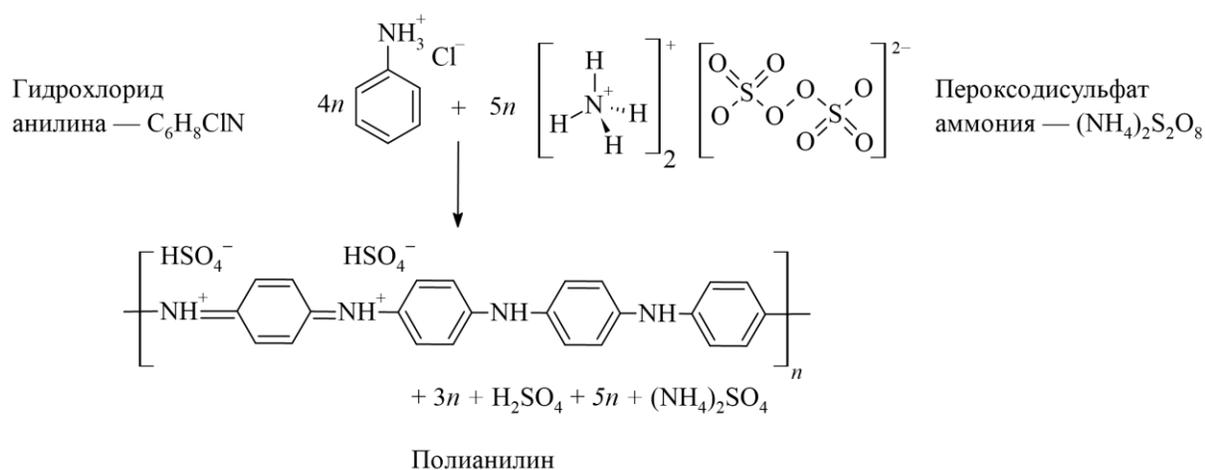
Мультикапилляры – тип перспективных носителей, образованных набором микрокапилляров с высокой развитостью поверхности, в последнее время все чаще применяющийся в различных аналитических приложениях [135]. Различные типы полимеров и марок стекла применяются для производства мультикапилляров. Мультикапилляры, применённые в исследовании получены из стеклянных заготовок. Целью данной главы является установление закономерностей и специфики получения ПАНИ МИП, специфичных к высокомолекулярным соединений (ПХ) на поверхности стеклянных мультикапилляров.

Основными задачами данной главы являлись:

- изучение возможности увеличения сорбционной емкости поверхности стеклянных носителей;
- получение ПАНИ МИП на поверхности стеклянных носителей;
- изучение морфологии полученных ПАНИ МИП;
- определение аналитических свойств полученных ПАНИ МИП.

### 3.1 Синтез ПАНИ МИП

ПАНИ МИП получали по методу описанному в [19]. В качестве функционального мономера использовали  $C_6H_8ClN$ , окислительную полимеризацию которого проводили по методике [119] согласно схеме.



Изучена возможность, получения ПАНИ МИП на поверхности стеклянного носителя без предварительной модификации. Установлено, что низкая сорбционная емкость поверхности носителя, оказывает негативное влияние на структуру ПАНИ МИП. Полученные наноструктуры ПАНИ, плохо воспроизводились, характеризовались неравномерным распределением по поверхности носителя, а также низкими адгезией и механической прочностью.

Это не позволило применять носители без модификации для сорбции молекул шаблонов. Предварительная модификация поверхности носителя, за счет синтеза удерживающего слоя ПАНИ, позволила устранить данные недостатки.

### ***3.1.1 Удерживающий слой ПАНИ***

Известно [136], что для получения равномерного покрытия из ПАНИ можно использовать реакцию окислительной полимеризации в сильноокислых и основных средах. Методика модификации внутренней поверхности стеклянных носителей (мультикапилляра и предметного стекла), использованная в работе представлена [19] и в разделе 2.2.1. Установлено, что присутствие следов окислителя препятствует последующему фотометрическому определению ПХ по реакции окисления ТМБ. В связи с этим необходимо нейтрализовать остатки окислителя, располагающегося в синтезированной полимерной структуре удерживающего слоя. Показана возможность использования  $C_6H_8O_6$  для нейтрализации окислителя.

Образцы предметного стекла применяли для изучения морфологии поверхности синтезированного слоя ПАНИ, а мультикапилляра для определения толщины и равномерности слоя. Образцы носителей, изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Установлено, что на внутренней поверхности, как мультикапилляров, так и предметных стекол образуется, равномерное покрытие ПАНИ (рис. 4).

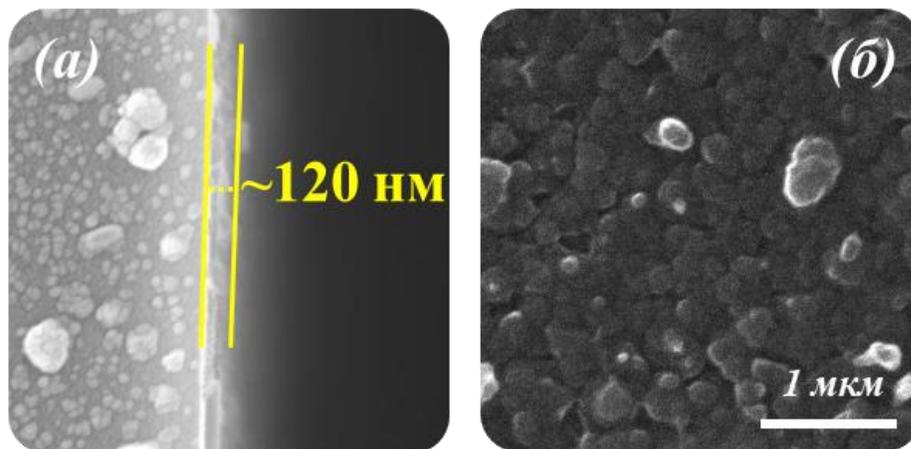


Рисунок 4. СЭМ изображения торцевого среза мультикапилляра (а) и поверхности предметного стекла (б) после формирования удерживающего слоя ПАНИ

Согласно СЭМ, удерживающее покрытие состоит из плотно размещенных НЧ ПАНИ со средним размером  $\sim 100 \pm 15$  нм, при этом толщина образованного слоя составила  $\sim 120$  нм и сопоставима с размером частиц. Этот факт свидетельствует о том, что в результате синтеза образуется монослой НЧ ПАНИ. Изучена удерживающая способность покрытия. Иммунизацию раствора ПХ (20 нг/мл, ФСБ) проводили на поверхность ПАНИ модифицированных мультикапилляров. Динамическую десорбцию белковых молекул осуществляли с помощью ФСБТ (6 мл, 100 мкл/мин). Затем образцы заполняли ТМБ субстратом, инкубировали, полученный раствор переносили в лунки микропланшета с заранее внесенным раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,5 % об.) и регистрировали спектры поглощения в диапазоне 300–500 нм. Установлено, отсутствие изменения окраски и спектральных характеристик ТМБ субстрата, что свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции белковых молекул на модифицированной поверхности, после удаления неспецифически

связанных молекул шаблона. Модифицированные образцы носителей использовали для последующего синтеза ПАНИ МИП.

### ***3.1.2 Получение ПАНИ МИП***

Стоит обратить внимание, что получение ПАНИ МИП, специфичных к белковым молекулам шаблонам, с использованием стандартной методики [136] окислительной полимеризации имеет существенные ограничения. Это обусловлено рядом свойств белковых молекул, а именно низкой стабильностью конформации в сильнокислых и основных средах, а также в присутствии сильных окислителей. В то же время в биоимпринтинге предпочтительно использование поверхностного молекулярного импринтинга, а образованная полимерная матрица МИП должна быть представлена надмолекулярными структурами с высокоразвитой поверхностью, кратно увеличивающей эффективность очистки. Для получения таких структур методом окислительной полимеризации анилина необходимо проводить синтез в слабокислой среде. В результате, основным продуктом синтеза ПАНИ являются нанотрубки с высокой полидисперсностью, тонкими стенками и молекулярной массой  $\sim 30\ 000$  Да [137]. С нашей точки зрения, такие структуры перспективны для использования в качестве матриц при биоимпринтинге белков.

Получение ПАНИ МИП на внутренней поверхности предварительно модифицированных мультикаппиляров и образцов предметного стекла проводили в слабокислой среде (раздел 2.2.1). Изучено влияние наиболее важных параметров импринтинга (концентрации молекулы шаблона (50–1000 мкг/мл), концентрации HCl (0,5-10 ммоль/л), функционального мономера (135-205 мкмоль/л) и окислителя (150-225 мкмоль/л), а так же времени проведения импринтинга на сорбционную емкость полученных ПАНИ МИП.

Значительное снижение ферментативной активности ПХ в реакционных смесях наблюдали при концентрациях  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8 > 300$  мкмоль/мл и  $\text{HCl} > 10$  ммоль/л.

Увеличение концентраций  $\text{C}_6\text{H}_8\text{ClN}$  (от 165 до 205 мкмоль/л) и  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (от 185 до 225 мкмоль/л) в реакционной смеси и при проведении импринтинга в  $\text{HCl}$  (0,5–1 м моль/л) позволило сформировать на поверхности носителей нанопроволоки ПАНИ-МИП с диаметром  $\sim 500$  нм. Однако при увеличении диаметра нанопроволоки от 150 до 500 нм наблюдалось уменьшение эффективности сорбции ПХ и, по-видимому, связано с ухудшением эффективности очистки МИП ПАНИ от молекул шаблона. Во всех случаях наиболее воспроизводимые наноструктуры получены при проведении импринтинга в течение 1 часа, а максимальная эффективность сорбции ( $\sim 70\%$ ) достигнута при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: молекула шаблона (1 мг/мл),  $\text{HCl}$  (0,6 ммоль/л), функционального мономера (155 мкмоль/л) и окислителя (175 мкмоль/л). При выбранных условиях импринтинга на поверхности носителей получали нанопроволоки со средним размером от 100 до 160 нм. СЭМ изображения образцов предметного стекла с полученными ПАНИ МИП и НИП представлены на рисунке 5.

В аналогичных условиях, проведено получение ПАНИ НИП. Стоит обратить внимание, что морфология поверхности в случае таких образцов, характеризуется отсутствием нанопроволоки (рис. 5б). Структура ПАНИ в случае НИП представлена в виде неравномерно распределённых микроразмерных фрагментов ПАНИ. Известно, что реакция полимеризация анилина является автокаталитической и протекает с понижением pH [137]. Образование нанопроволоки при синтезе МИП в оптимальных условиях синтеза, вероятно, вызвано буферным воздействием белковой молекулы на

микроокружение, которое предотвращает снижение рН и последующее образование микрофрагментов ПАНИ вместо наноструктур. СЭМ изображение образца МК, после синтеза ПАНИ МИП, представлено на рисунке 6.

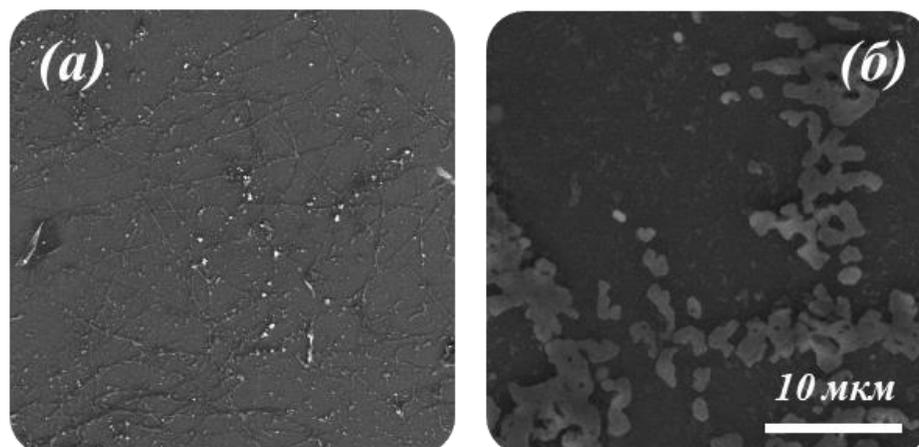


Рисунок 5. СЭМ изображения поверхности предметного стекла покрытых ПАНИ МИП (а) и НИП (б)

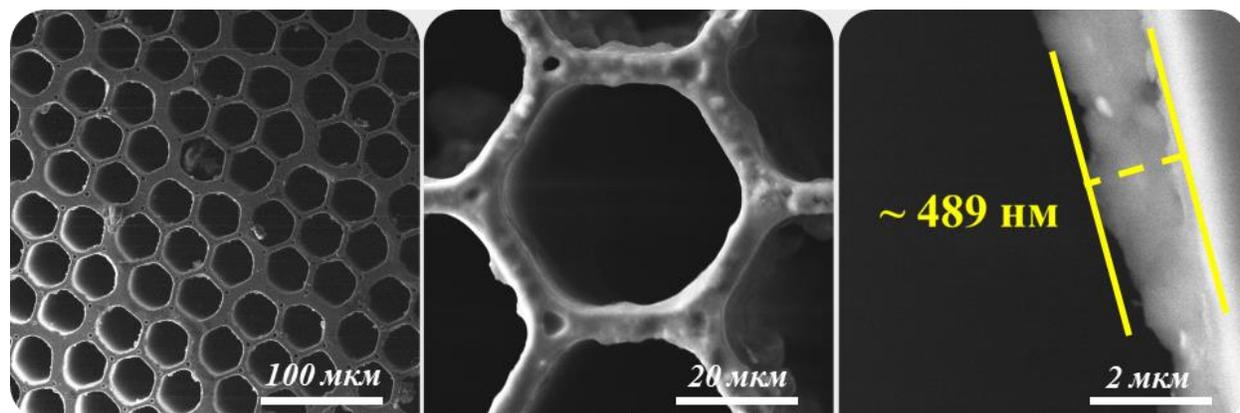


Рисунок 6. СЭМ изображения торцевого среза мультикапилляра после синтеза ПАНИ МИП

Стоит обратить внимание, что толщина слоя ПАНИ на поверхности мультикапилляра при синтезе МИП увеличивается  $\sim 4$  раза. Это может быть

обусловлено тем, что при синтезе МИП отдельные наноструктуры ПАНИ накладываются друг на друга и затрудняют возможность их наблюдения со стороны торцевого среза. Однако значительное увеличение толщины слоя ПАНИ подтверждает формирование ПАНИ МИП на внутренней поверхности мультикапилляра.

Ключевой стадией процесса молекулярного импринтинга является стадия очистки рецепторных элементов от молекул шаблона и непрореагировавших компонентов реакции. Для оптимизации этого процесса нами предложено использовать водный раствор  $C_6H_8O_6$ , который позволяет как удалить избыток окислителя, так и очистить рецепторный элемент от белковых молекул шаблонов. Для подтверждения эффективности предложенной методики удаления молекул шаблона ТМБ инкубировали (60 мин) на образце предметного стекла, модифицированного ПАНИ МИП, после проведения очистки. Установлено, отсутствие изменения окраски и спектральных характеристик ТМБ, что означает отсутствие молекул шаблона и непрореагировавшего окислителя в структуре ПАНИ МИП, после очистки.

Интерес представляет изучение возможных структурных изменений ПАНИ МИП после сорбции молекул шаблонов. На образец предметного стекла, модифицированного ПАНИ МИП, наносили раствор ПХ (1 мкг/мл) и иммобилизовали в течение 60 мин, после чего проводили колориметрическое определение ПХ с использованием ТМБ-субстрата. Изменение окраски субстрата свидетельствует об успешной иммобилизации ПХ на поверхности носителя модифицированного ПАНИ МИП. СЭМ изображение образца после иммобилизации ПХ представлены на рисунке 7.

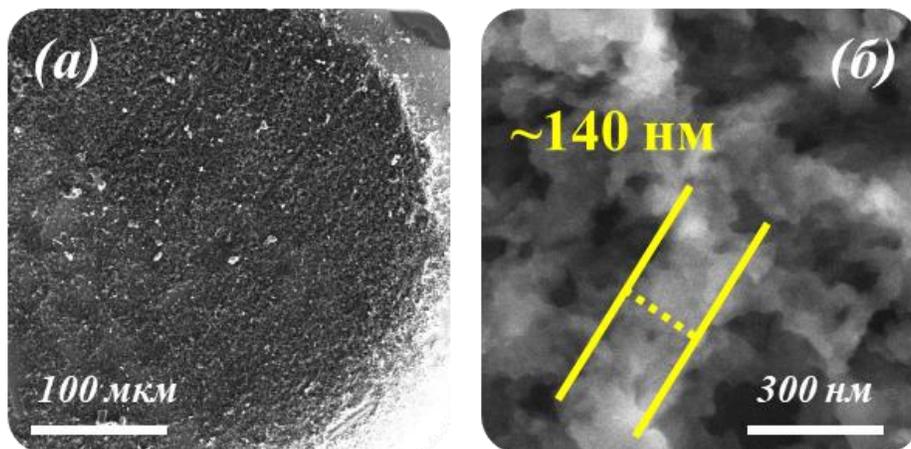


Рисунок 7. СЭМ изображения поверхности предметного стекла после иммобилизации ПХ на ПАНИ МИП

СЭМ-изображения демонстрируют изменение в морфологии ПАНИ МИП после сорбции молекул шаблонов. Структура становится более рыхлой и состоит из фрагментов нанопроволок ПАНИ. Аналогичная структура ПАНИ наблюдалась при формировании удерживающего слоя. При этом структурные элементы слоя имели большей диаметр, что видимо вызвано синтезом в сильноокислых условиях и больших концентрациях функционального мономера и окислителя.

ИК-Фурье спектроскопия широко применяется для характеристики молекулярно импринтированных полимеров. Однако материал носителей, использованных в исследовании, ограничивает возможность применения ИК-Фурье спектроскопии. В связи с этим для регистрации ИК спектров проведено получение ПАНИ МИП на поверхности кристалла селенида цинка. Полученные ИК спектры представлены на рисунке 8.

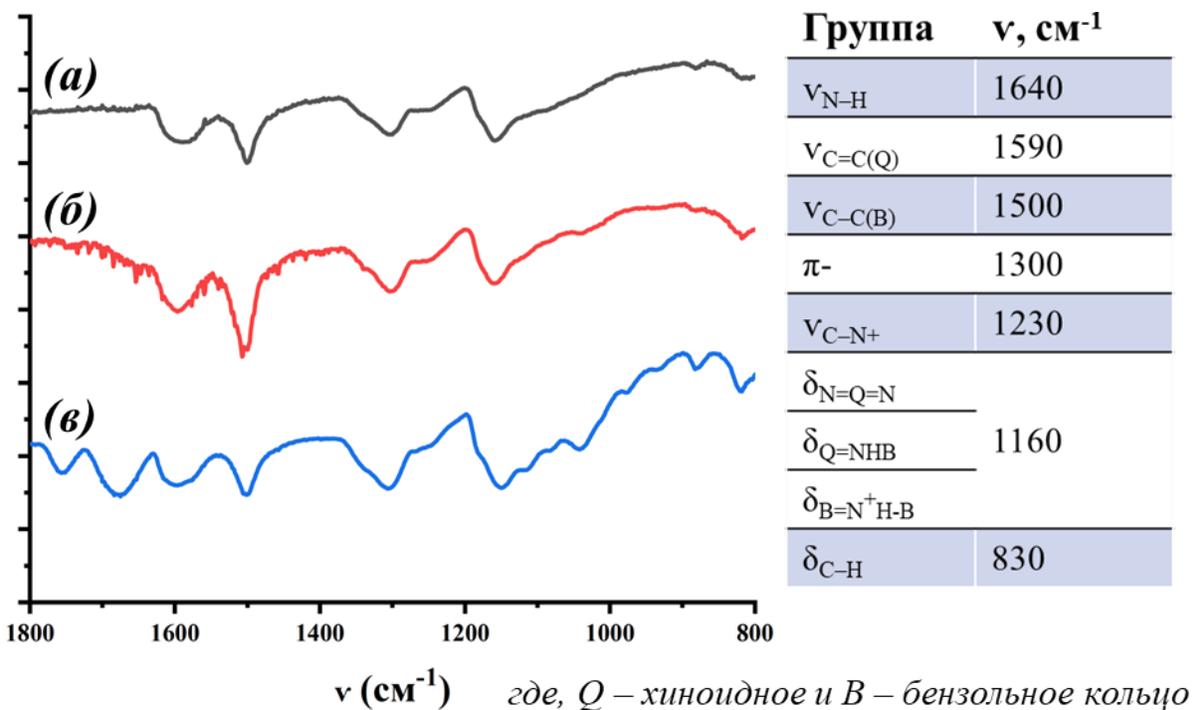


Рисунок 8. ИК-Фурье спектры пленок ПАНИ (а), ПАНИ МИП до (б) и после (в) иммобилизации ПХ

ИК-спектры плёнок ПАНИ и МИП характеризуются близкими профилями и отличаются в основном по интенсивности спектральных полос. Полосы при 1590 и 1500  $\text{cm}^{-1}$  могут быть отнесены к валентному колебанию в хиноновом ( $\nu_{\text{C=C(Q)}}$ ) и бензольном ( $\nu_{\text{C=C(B)}}$ ) кольцах соответственно. Полоса при 1160  $\text{cm}^{-1}$  может быть описана как объединение  $\delta_{\text{N=Q=N}}$  колебаний с  $\delta_{\text{Q=NHB}}$  и  $\delta_{\text{(B=N+H-B)}}$ , проявляющихся при протонировании. Полоса при 830  $\text{cm}^{-1}$  соответствует  $\delta_{\text{C-H}}$ , находящимся как в плоскости, так и вне плоскости ароматических колец, а 1300  $\text{cm}^{-1}$  соответствует делокализованным  $\pi$ -электронам [138]. При наличии молекул шаблона в молекулярных отпечатках наблюдается незначительная трансформация спектров, а именно появление полосы на 1640  $\text{cm}^{-1}$ , которую можно отнести к  $\nu_{\text{N-H}}$ -колебаниям водородной связи, образованной между ПХ и ПАНИ. Слабоинтенсивная полоса 1230  $\text{cm}^{-1}$  может быть отнесена к полярной структуре  $\nu_{\text{C-N}^+}$ . Формирование комплекса

ПАНИ–белок, происходит при присоединении молекулы шаблона к полимеру через водородные связи.

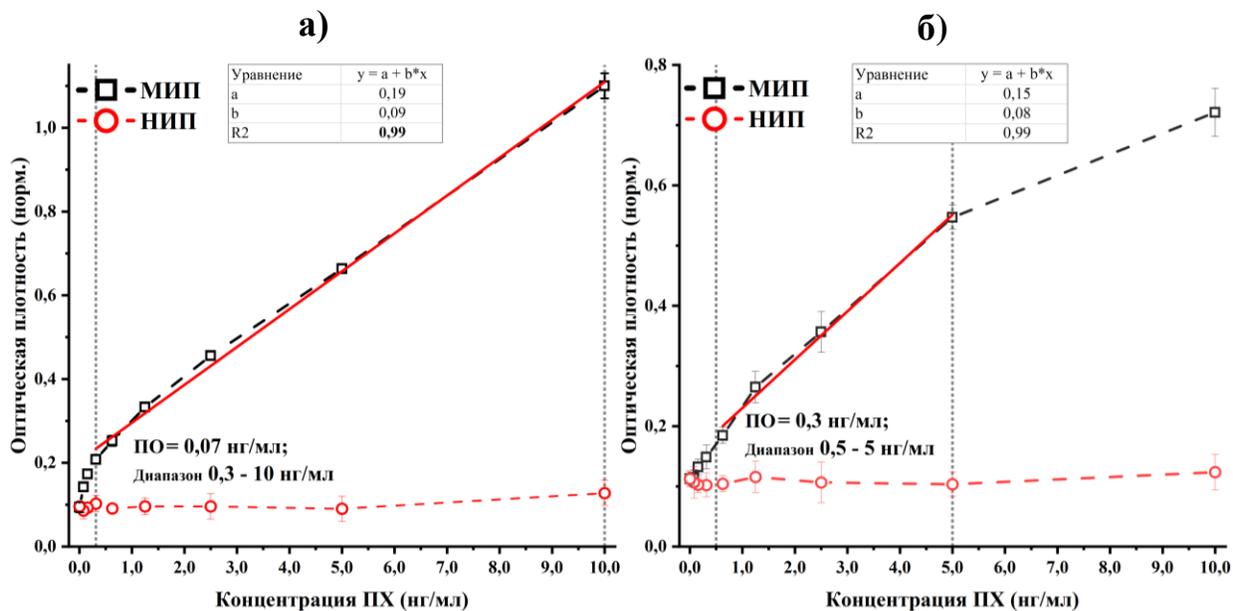
### **3.2 Аналитические характеристики ПАНИ МИП**

Оценены аналитические характеристики ПАНИ МИП на поверхности стеклянных носителей. Для этого проводили иммобилизацию модельных растворов ПХ (0,05–10 нг/мл, ФСБ) на поверхности носителей модифицированных ПАНИ МИП и НИП. В случае образцов мультикапилляров инкубацию растворов ПХ проводили в течение 15 минут, а для предметных стекол время инкубации было увеличено до 60 минут. Удаление неспецифически сорбированных молекул определяемого вещества проводили в формате динамической и статической десорбции для образцов мультикапилляров и предметных стекол применяя ФСБТ (6 мл, 200 мкл/мин) и (5 мл, 3х), соответственно. После чего проводили колориметрическое определение ПХ, сорбированной на поверхности носителей модифицированных ПАНИ МИП. Градуировочная зависимость для определения ПХ представлены на рисунке 9.

Полученные результаты позволяют проводить определение ПХ в широком диапазоне концентраций с использованием ПАНИ МИП, полученных на поверхности мультикапилляра. В случае ПАНИ НИП интенсивность поглощения при длине волны 450 нм совпадала со значениями чистого ТМБ. Это свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции ПХ на поверхность образцов без нанопроволоки ПАНИ.

Важной аналитической характеристикой МИП, является сорбционная емкость. Для расчета сорбционной емкости проводили фотометрическое определение ПХ (0,05–10 нг/мл, ФСБ) в модельных растворах до иммобилизации и после иммобилизации, а также непосредственно на

поверхности образца мультикапилляра, модифицированного ПАНИ МИП. Значения оптической плотности и степень извлечения, представлены на рисунке 10.



Носитель	ПО, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл
мультикапилляр	0,07	0,3–10
предметное стекло	0,3	0,5–5

Рисунок 9. Градуировочная зависимость определения ПХ на образце мультикапилляра (а), предметного стекла (б) модифицированных ПАНИ МИП

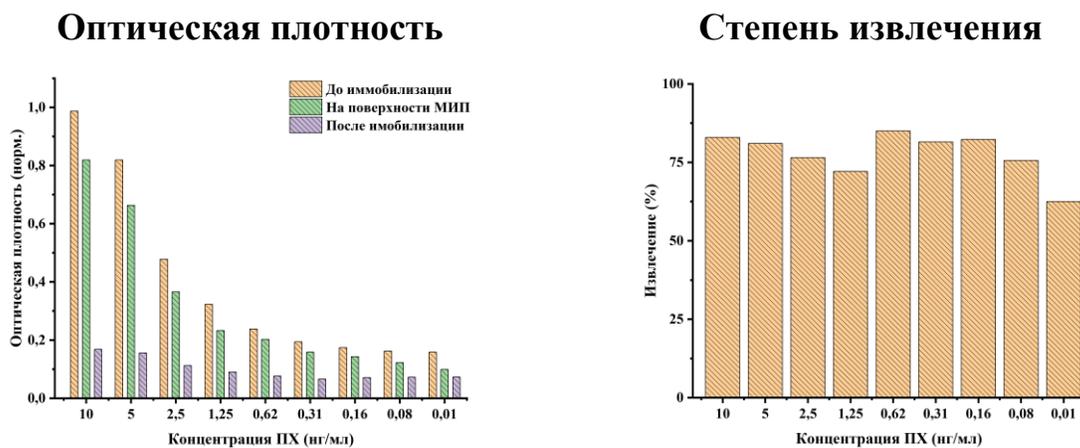


Рисунок 10. Сорбционные характеристики образца мультикапилляра, модифицированного ПАНИ МИП

Степень извлечения при иммобилизации растворов с различной концентрацией ПХ составила от 62,5 до 85%. Низкое значение степени извлечения при иммобилизации минимальной концентрации ПХ, вероятно, вызвано значительным уровнем фонового сигнала ТМБ.

Селективность ПАНИ МИП изучена на примере растворов белковых смесей, содержащих ПХ, овальбумин и ГО. Селективность к овальбумину определяли с использованием электрофоретического разделения в полиакриламидном геле додецилсульфата натрия. Селективность к ГО определена с помощью методики основанной на уменьшении интенсивности сигнала люминесцентного субстрата на основе КТ и глюкозы [120]. После иммобилизации белковых смесей образцы мультикапилляров заполняли люминесцентным субстратом, инкубировали в течение 1 часа и регистрировали спектры люминесценции КТ. Оценки селективности полученных ПАНИ МИП к Овальбумину и ГО представлены на рисунке 11.

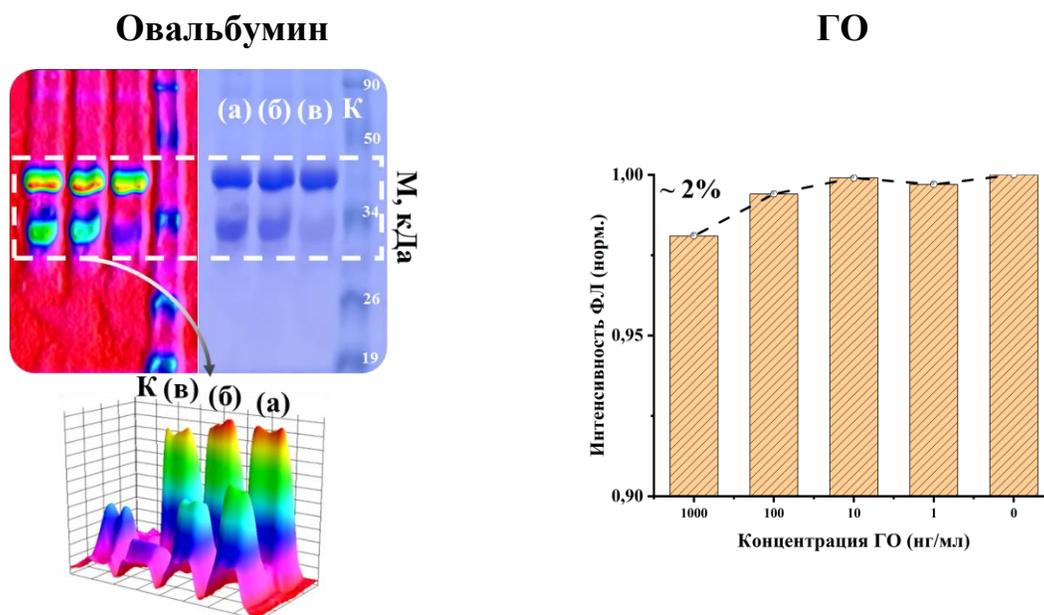


Рисунок 11. Селективность ПАНИ МИП при извлечении ПХ из белковых смесей ПХ с овальбумином и ГО

Результаты показывают, что в образцах белковых смесей после иммобилизации на образцах мультикапилляров, модифицированных ПАНИ МИП, наблюдалось уменьшение (~50%) интенсивности окраски по сравнению с контрольной смесью зоны геля, содержащей ПХ и незначительное уменьшение (~5%) интенсивности в области геля, содержащей овальбумин. Незначительное (~2%) уменьшение интенсивности флуоресценции люминесцентного субстрата указывает на отсутствие неспецифичной сорбции ГО на образцах МК, модифицированных ПАНИ МИП.

### *Заключения по главе 3*

Таким образом, успешно получены ПАНИ МИП на поверхности стеклянных носителей: МК и предметных стекол. Установлена необходимость синтеза удерживающего слоя ПАНИ в течение 1,5 мин при соблюдении соотношения  $C_6H_8ClN$  (10 ммоль/л, 100 мкл) и  $(NH_4)_2S_2O_8$  (12,5 ммоль/л, 100 мкл) 1:1,25 в HCl (0,2 ммоль/л). Определены оптимальные параметры получения ПАНИ МИП. Процесс импринтинга должен проходить в течение 60 минут при соблюдении соотношения  $C_6H_8ClN$  (155 мкмоль/л, 500 мкл) и  $(NH_4)_2S_2O_8$  (175 мкмоль/л, 500 мкл) 1:1,1 в HCl (0,6 ммоль/л). Предложено использование  $C_6H_8O_6$ , для удаления избытка непрореагировавших компонентов синтеза ПАНИ и молекул шаблона из рецепторных элементов. Проведена характеристика структуры ПАНИ МИП и НИП на всех этапах процесса импринтинга, до и после извлечения молекул шаблона из модельного раствора, с использованием СЭМ и ИК-Фурье спектроскопии.

Показана возможность применения образцов мультикапилляров, модифицированных ПАНИ МИП для определения ПХ в диапазоне 0,3–10 нг/мл и ПО 0,07 нг/мл. Эффективность извлечения ПХ из модельных растворов на поверхность модифицированную ПАНИ МИП, составила от 62,5 до 85% с высокой специфичностью (ИФ > 10). Полученные МИП характеризуются высокой селективностью к не целевым белковым молекулам. В случае молекул имеющих близкую молекулярную массу с ПХ величина не специфической сорбции составила 5%, при мольном соотношении овальбумин:ПХ равном 2:1. В случае молекулы с большей молекулярной массой уровень не специфической сорбции составил 2%, при мольном соотношении ГО:ПХ равном 43:1.

## **ГЛАВА 4. БИОИМПРИНТИГ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА В МАТЕРИАЛАХ ПОЛИУРЕТАНА И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИГА**

Одним из эффективных методов получения нано- и микроволокон и материалов на их основе является электроспиннинг. Материалы, полученные методом электроспиннинга характеризуются высокой сорбционной емкостью, хорошей воспроизводимостью структуры, относительно простой техникой получения. К преимуществам применения электроспиннинга для получения МИП можно отнести: возможность применения широкого круга синтетических и природных полимеров в различных растворителях, высокую производительность метода.

В настоящее время существует три подхода к проведению молекулярного импринтинга таких материалов:

- [67]импринтинг при формировании волокон [64]
- молекулярный импринтинг поверхности волокон после завершения процесса электроспиннинга [65]
- твердофазный импринтинг [66,67]

В случае биоимпринтинга наиболее перспективным представляется применение твердофазного импринтинга, в котором растворитель, оказывает минимальное влияние на конформацию белковой молекулы. Полученные сайты связывания в структуре полимера будут максимально комплементарны белковой молекуле, что предполагает возможность значительного увеличения селективности извлечения.

Основными задачами данной главы являлись:

- изучение возможности получения эпМИП методом твердофазного импринтинга на поверхности стеклянного носителя;
- оптимизация параметров получения эпМИП;
- характеристика полученных ПАНИ МИП;
- определение аналитических свойств полученных ПАНИ МИП.

#### **4.1 Получение молекулярно импринтированных материалов на основе ПУ и ПВП, полученных методом электроспиннинга**

Получение молекулярно импринтированных материалов методом твердофазного импринтинга, можно разделить на три основные стадии: иммобилизация белковой молекулы на поверхности носителя, электроспиннинг полимера на поверхность носителя, отделение молекулярно импринтированного материала от поверхности носителя.

Оригинальная методика [67] твердофазного импринтинга использует в качестве носителя форму из полидиметилсилоксана (ПДМС), иммобилизацию молекул шаблонов, на поверхность которой проводят в несколько этапов. На первом поверхность ПДМС активировали смесью концентрированных растворов  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 75:25$  (об.), после чего поверхность функционализировали с использованием АПТЕС. Для обеспечения максимально эффективного взаимодействия белковой молекулы с аминированной поверхностью ПДМС формы, проводили активацию аминогрупп с применением N-гидроксисукцинимидом и диметиламинопропилэтилкарбодиимида. Заключительный этап включал иммобилизацию белковых молекул при  $4^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. На следующем

этапе проводили электроспиннинг, при котором ПДМС форму устанавливали на коллектор установки, представленной на рисунке 2. В качестве полимера использовали сополимер полимолочной и полигликолевой кислот. Для получения материала с достаточной толщиной процесс электроспиннинга выполняли в течение 4 часов, после чего мат отделяли от формы и использовали для дальнейших исследований. На основе описанной выше методики нами разработана методика молекулярного импринтинга материалов, полученных методом электроспиннинга для определения ПХ (рис. 12).

В качестве носителя предложено использование предметного стекла, функционализацию которого проводили согласно схеме модификации внутренней поверхности МОВ [122]. Для аминирования поверхности носителя использован АПТЕС, а для ковалентного связывания белковой молекулы (ПХ) с модифицированной поверхностью носителя применяли ГА. Для проведения электроспиннинга предложено использование двух полимеров – ПУ и ПВП. Интерес к ПУ, обусловлен тем, что он является биоразлагаемым полимером и широко применяется в медицинской практике, а получение нановолокон на основе ПВП методом электроспиннинга хорошо изучено [60].

#### ***4.1.1 Получение материала из полиуретана***

Впервые применение ПУ для получения волокон методом электроспиннинга описано в [139]. Нами изучено влияние условий на электроспиннинг ПУ: концентрация полимера (6,6–13,3% масс.), скорость подачи полимера в электрическое поле (1–50 мкл/мин), время получения мата (1–60 мин), расстояние от иглы до коллектора (14–23 см). Выбор напряжения зависит от относительной влажности при синтезе. На рисунке 13 представлены изображения микроволокон, в различных условиях. Установлены

оптимальные параметры получения микроволокон из ПУ: концентрация полимера (13,3% масс.), скорость подачи полимера (1 мкл/мин), время получения мата (40 мин). При использовании дистанции 20 см удается достигнуть максимальной равномерности распределения волокон по поверхности стеклянного носителя, без капель полимера.

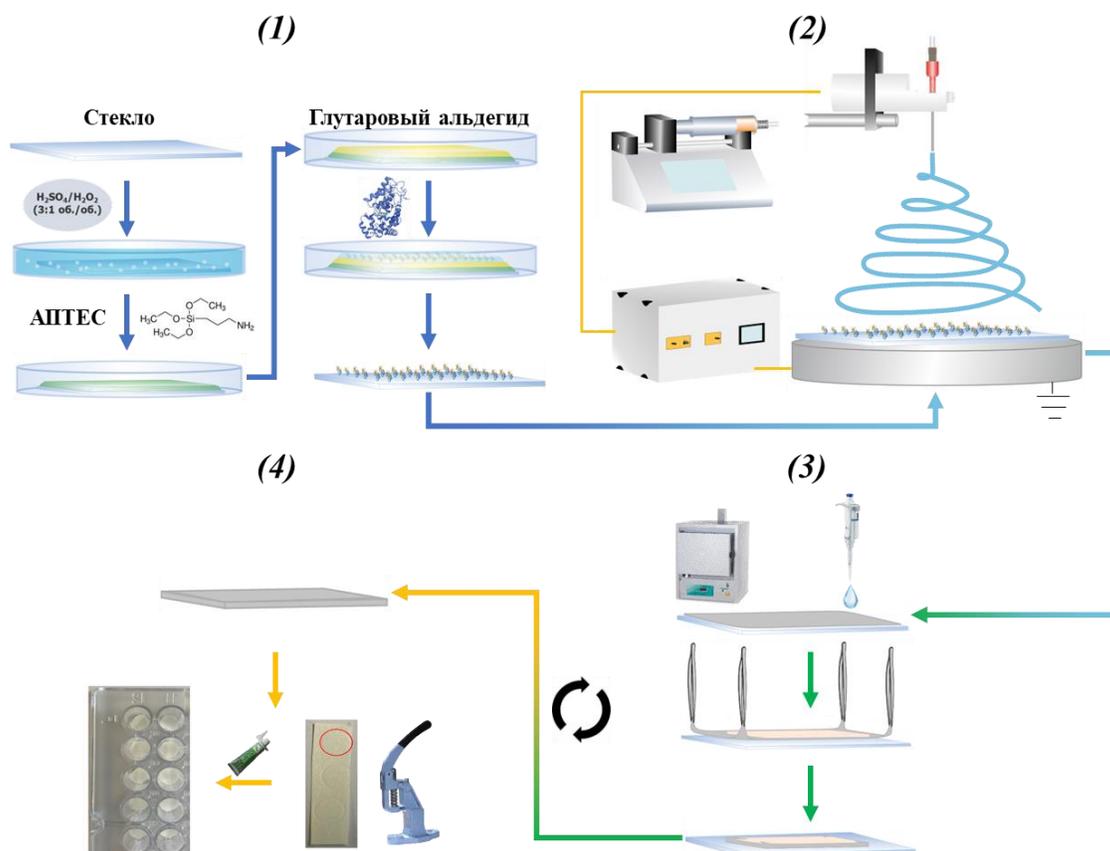


Рисунок 12. Схема проведения твердофазного импринтинга: иммобилизация молекулы шаблона на поверхности носителя (1), получение материала эпМИП методом электроспиннинга (2), отделение материала эпМИП (3), приготовление фрагментов материала (4).

Установлено, что увеличение диаметра иглы приводит к увеличению среднего диаметра волокон, что связано с увеличением площади соприкосновения капли полимера и электрического поля. В дальнейшей работе

использовали иглу с внутренним диаметром 0,5 мм. Несмотря на то, что оптимальным временем получения мата без склеивания волокон является 40 мин, толщина такого слоя не обеспечивает достаточной прочности для последующего переноса волокон на фильтровальную бумагу. Поэтому нанесение волокон на предметное стекло проводили в течение 60 мин. Микрофотография полученного материала, представлена на рисунке 14.

После переноса молекулярно импринтированного материала на основе волокон ПУ на фильтровальную бумагу наблюдалась полная деформация структуры волокон и образование слоя ПУ на поверхности целлюлозных волокон фильтровальной бумаги. На рисунке 15, представлены СЭМ изображения образца фильтровальной бумаги после переноса импринтированного материала из ПУ. Полученные данные свидетельствуют о невозможности получения молекулярно импринтированных волокон ПУ методом твердофазного импринтинга. Однако полученный материал выступает в роли дополнительного слоя на поверхности целлюлозных волокон, характеризующегося наличием сайтов связывания. Таким образом представленный подход получения молекулярно импринтированного материала из ПУ может быть использован для проведения поверхностного импринтинга различных носителей. Однако неравномерность покрытия может оказать негативное влияние на равномерность распределения сайтов связывания на поверхности носителя и уменьшить воспроизводимость результатов как анализа, так и сорбции.

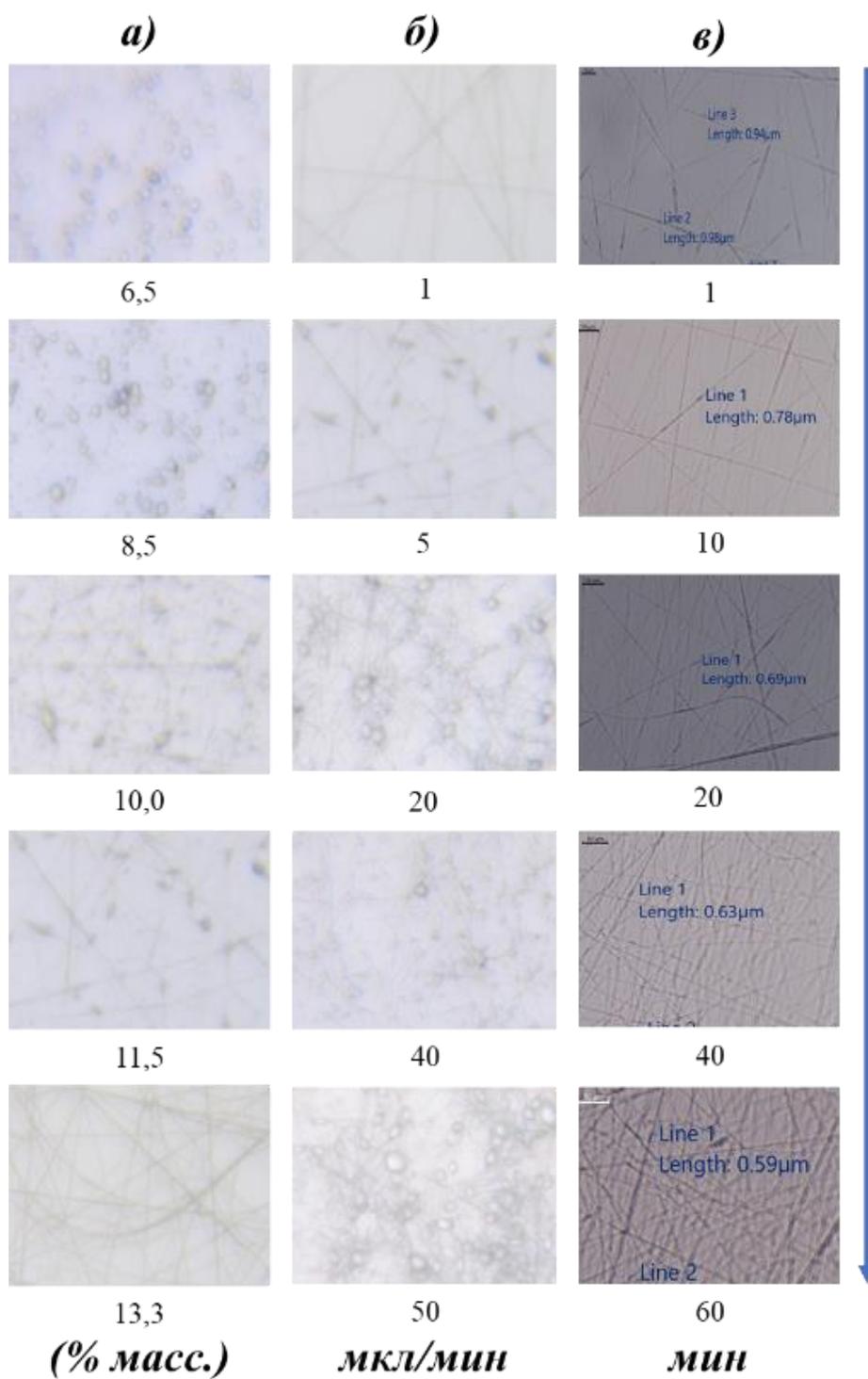


Рисунок 13. Фотографии микроволокон ПУ, полученных методом электроспиннинга, при варьировании концентрации полимера (а), скорости подачи полимера в электрическое поле (б) и времени получения мата (в)

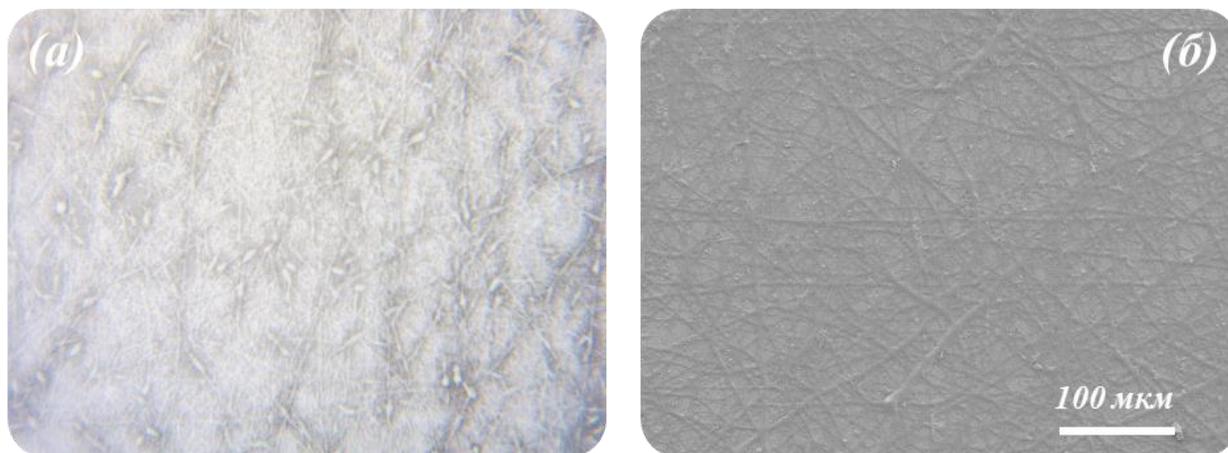


Рисунок 14. Фотография (а) и СЭМ изображение (б) внешней стороны волокон ПУ после проведения твердофазного импринтинга

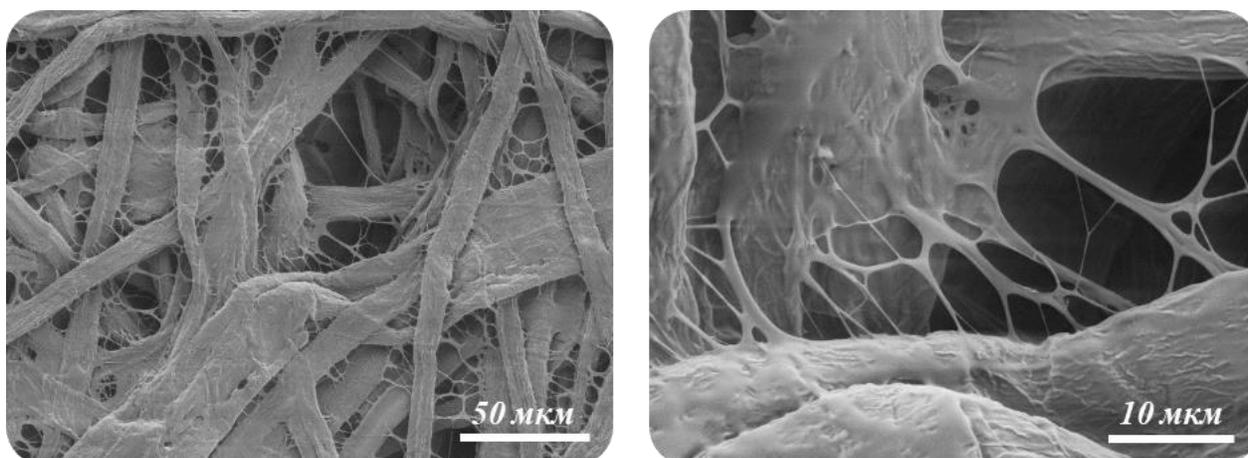


Рисунок 15. СЭМ изображение структуры внутренней стороны импринтированного материала ПУ после переноса на фильтровальную бумагу

Полученные данные свидетельствуют о невозможности получения молекулярно импринтированных волокон ПУ методом твердофазного импринтинга. Однако полученный материал выступает в роли дополнительного слоя на поверхности целлюлозных волокон, характеризующегося наличием сайтов связывания. Таким образом представленный подход получения молекулярно импринтированного

материала из ПУ может быть использован для проведения поверхностного импринтинга различных носителей. Однако неравномерность покрытия может оказать негативное влияние на равномерность распределения сайтов связывания на поверхности носителя и уменьшить воспроизводимость результатов как анализа, так и сорбции.

#### ***4.1.2 Получение материала из ПВП***

Для получения волокон ПВП использованы оптимальные условия синтеза [60]: концентрация полимера (14,0 % масс.), скорость подачи полимера (10 мкл/мин), время получения мата (15 минут), дистанция (15,5 см), внутренний диаметр иглы (0,5 мм). Изображения СЭМ молекулярно импринтированного материала из ПВП представлены на рисунке 16.

Установлено, что ПВП волокна характеризуются меньшим диаметром (~200 нм) по сравнению с волокнами из ПУ (~600 нм) и, как следствие, большей плотностью покрытия. Это позволяет снизить время для получения мата необходимой толщины, а также, в отличие от ПУ, использовать импринтированные материалы без дополнительного слоя фильтровальной бумаги. Использование такого материала позволяет снизить уровень фонового сигнала, неспецифическую сорбцию и потенциально использовать не только микропланшеты, но и другие аналитические платформы. ПВП является водорастворимым полимером, в связи с этим важным является изучение влияния буферного раствора (ФСБ), использованного для приготовления растворов ПХ, на структуру и параметры синтезированных молекулярно импринтированных волокон на основе ПВП. Разрушение структуры материала может препятствовать многократному использованию таких матов, а также приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам анализа. ФСБ инкубировали в течение 1 часа на поверхности волокон на

основе ПВП, проводили СЭМ исследование морфологии и структуры волокон. Результаты представлены на рисунке 17.

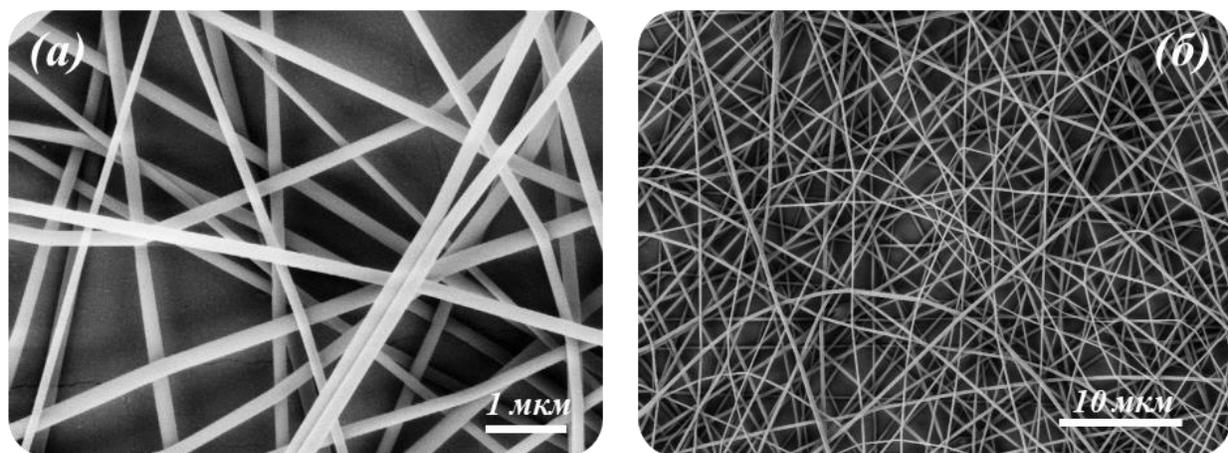


Рисунок 16. СЭМ изображения внешней стороны отдельных импринтированных волокон ПВП (а) и общий вид мата (б) после проведения твердофазного импринтинга

Показано, что диаметр волокон ПВП изменяется после инкубации в ФСБ. Однако структура слоя, в отличие от ПУ, сохранилась, что подтверждает возможность применения материала из ПВП для извлечения ПХ из модельных растворов. Для усиления механической прочности материал ПВП переносили на фильтровальную бумагу.

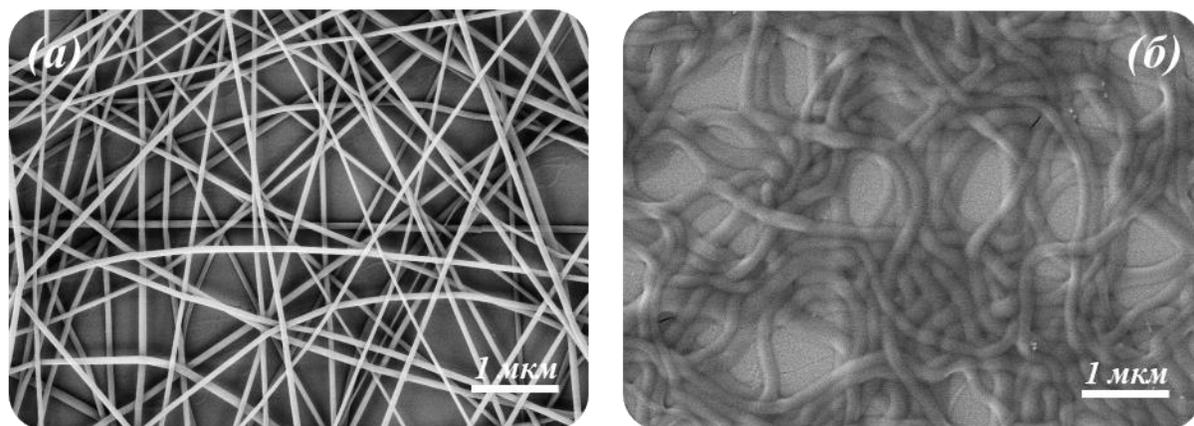


Рисунок 17. СЭМ изображения внутренней стороны импринтированных волокон ПВП до (а) и после (б) после инкубации в ФСБ

## 4.2 Аналитические характеристики молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга ПУ типа D4 и ПВП

Аналитические характеристики эпМИП ПУ изучали для образцов материала, зафиксированных на дне лунок микропланшета. Изучена специфичность (ИФ) извлечения ПХ (1 мкг/мл, ФСБ) на поверхность эпМИП ПУ. Общая схема извлечения и определения ПХ представлена на рисунке X.

Известно, что для избежания неспецифической сорбции целевых молекул на поверхности носителя, содержащего рецепторные элементы, необходимо проводить предварительную блокировку поверхности. Выполнение предварительной блокировки поверхности приводит к значительному увеличению специфичности сорбции, за счет минимизации сорбции целевых молекул на поверхности лунки микропланшета и неимпринтированных частей полимерного каркаса МИП. Изучено влияние условий предварительной блокировки на специфичность и воспроизводимость анализа ПХ с использованием эпМИП ПУ. На рисунке X представлены результаты определения ПХ, сорбированной на эпМИП и НИП ПУ.

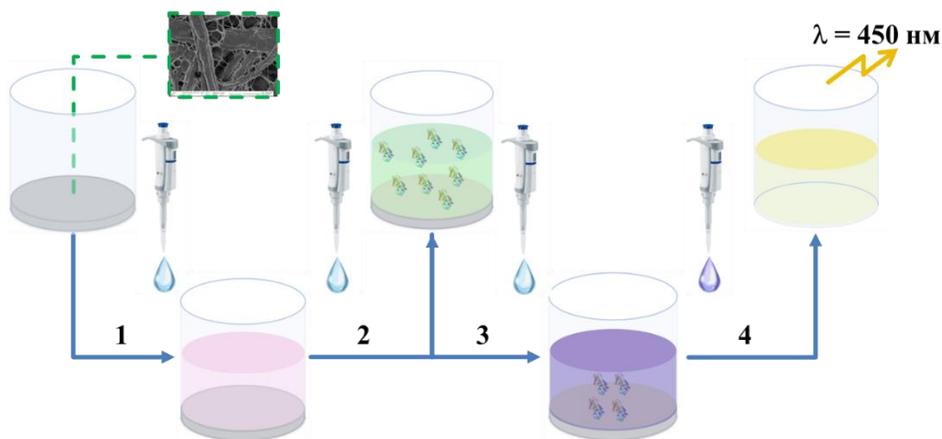


Рисунок 18. Схема извлечения и определения ПХ из модельных растворов с использованием фрагментов эпМИП: блокировка поверхности (1), инкубация раствора ПХ (2), внесение ТМБ (3), регистрация фотометрического сигнала (4)

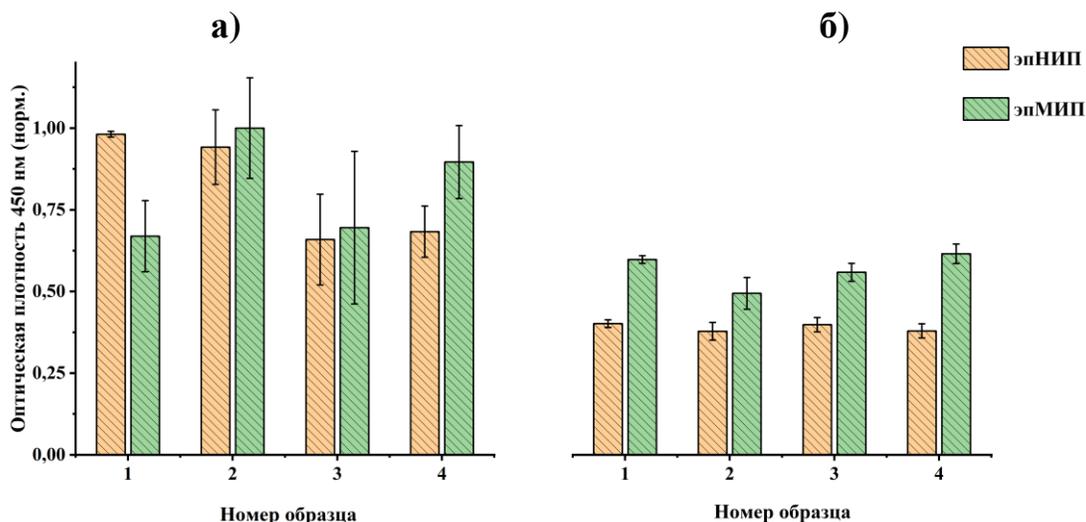


Рисунок 19. Влияние блокировки поверхности эпМИП и НИП на интенсивность оптического сигнала ТМБ (450 нм) после инкубации на образцах без (а) и после (б) блокировки (БСА 2% масс. ФСБ).

Установлено, что проведение предварительной блокировки поверхности фрагментов эпМИП и НИП приводит к уменьшению сорбции целевых молекул на ~28%. При этом наблюдается улучшение воспроизводимости результатов и увеличение специфичности сорбции на ~42 % (ИФ = 1,5).

Значительное влияние на сорбционные свойства эпМИП, полученных методом твердофазного импринтинга, могут оказывать параметры функционализации поверхности предметного стекла. В связи с этим рассмотрено (рис. 20) влияние времени функционализации поверхности, термической обработки, температуры и времени иммобилизации молекулы шаблона на поверхности функционализированного предметного стекла на сорбционные свойства полученных эпМИП.

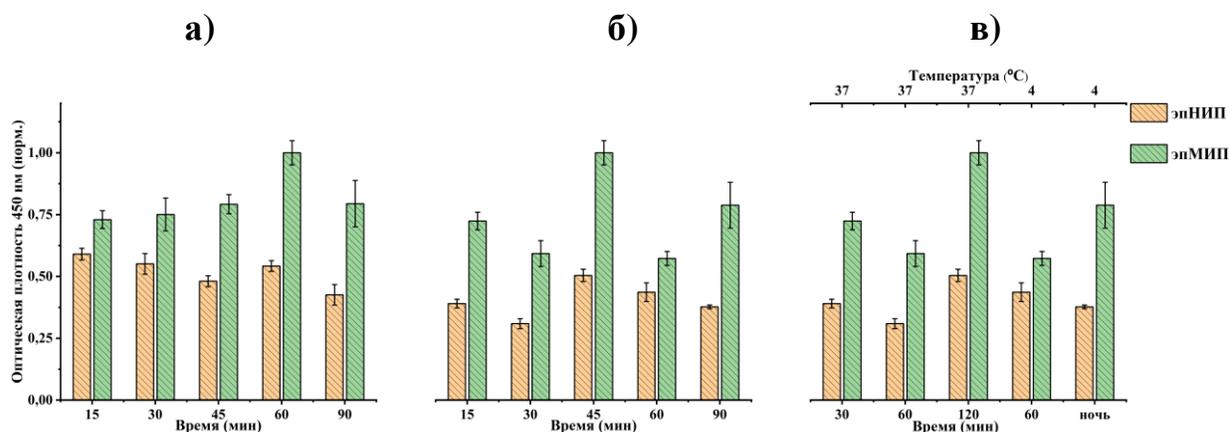


Рисунок 20. Влияние условий функционализации предметного стекла на сорбционные свойства эпМИП: время функционализации поверхности (а), термическая обработка поверхности (б), температура и время иммобилизации молекулы шаблона (в)

Среди изученных параметров функционализации носителя наибольшее влияние на специфичность извлечения ПХ на эпМИП оказывает время функционализации поверхности носителя. Согласно полученным результатам оптимальным является функционализация поверхности носителя в течение 60 мин, что обусловлено насыщением поверхности функциональными аминогруппами. Выбор оптимального времени позволил увеличить специфичность сорбции на ~30 % (ИФ = 1,8) при сохранении высокой воспроизводимости результатов.

Время термической обработки поверхности носителя функционализированного АПТЕС, также оказывает существенное влияние на специфичность сорбции. При оптимальном значении этого параметра (45 мин) наблюдали увеличение специфичности сорбции на ~20 % (ИФ = 2,0). Максимальное увеличение специфичности сорбции на 8% (ИФ = 2,1) достигается в случае инкубации раствора ПХ на поверхности модифицированного носителя в течение ночи при 4°C. Выбранные

оптимальные условия модификации носителя в дальнейшем использовали для получения эпМИП ПУ и ПВП.

Известно [19], что эффективность очистки полимерной матрицы оказывает значительное влияние на сорбционные свойства МИП. Изучено (рис. 21а) влияние стадии предварительной очистки на сорбционные свойства эпМИП. Оценено влияние концентрации БСА в блокирующем буферном растворе (рис. 21б), времени и температуры иммобилизации модельного раствора целевой молекулы (рис. 21в) на эффективность извлечения ПХ с использованием полученных эпМИП. Для удаления неспецифически связанных с поверхностью эпМИП белковых молекул из блокирующего буферного раствора и модельного раствора молекулы шаблона, на каждой стадии извлечения (рис. 18) проводили промывание лунок микропланшета с использованием ФСБТ. Тройная очистка с использованием ФСБТ, позволяет максимально увеличить специфичность (ИФ = 2,3) сорбции ПХ. Это обусловлено полным удалением молекул шаблона из полимерной матрицы эпМИП в присутствии поверхностно активного вещества в составе промывающего буферного раствора.

Концентрация БСА при блокировке также оказывает влияние на эффективность извлечения ПХ. Наилучшие результаты (ИФ = 2,4) получены при использовании ФСБ, содержащего БСА (1% масс.). При этом максимальное содержание ПХ на поверхности эпМИП достигнуто после блокировки поверхности ФСБ (БСА 0,25 % масс.), что обусловлено значительным уровнем неспецифически сорбированных молекул ПХ на поверхности лунки микропланшета и незаблокированных фрагментах полимерной сетки. При использовании блокировки ФСБ (БСА 2% масс.) наблюдали достаточно высокий уровень специфичности эпМИП ПУ (ИФ = 2,1). Однако, увеличение концентрации БСА более 1% масс. приводит к

уменьшению степени извлечения (~43%) ПХ, что связано с возможным перекрыванием доступных сайтов связывания молекулами БСА. Такой эффект известен и может негативно влиять на дальнейшее применение полученных эпМИП для определения высокомолекулярных веществ в конкурентном формате.

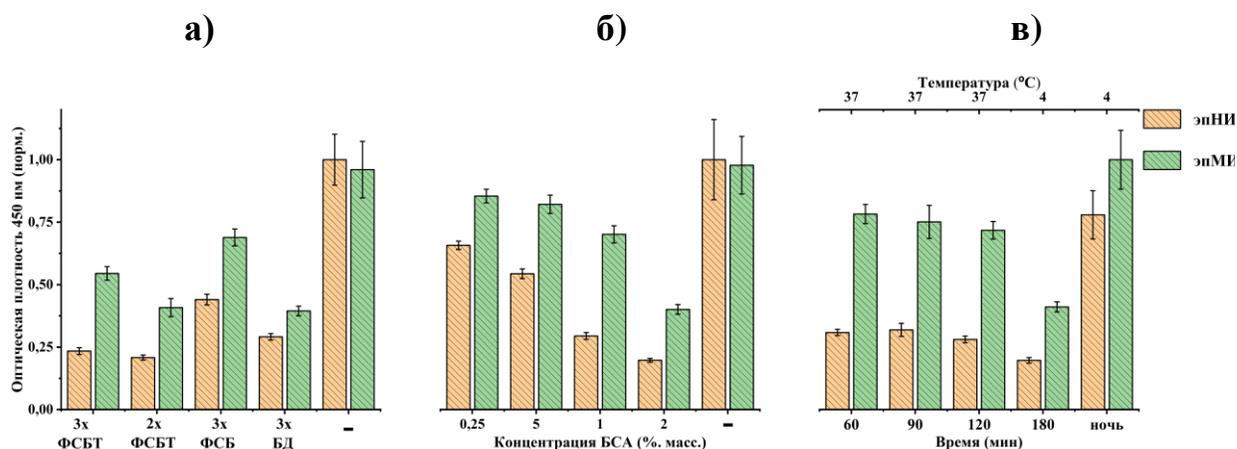


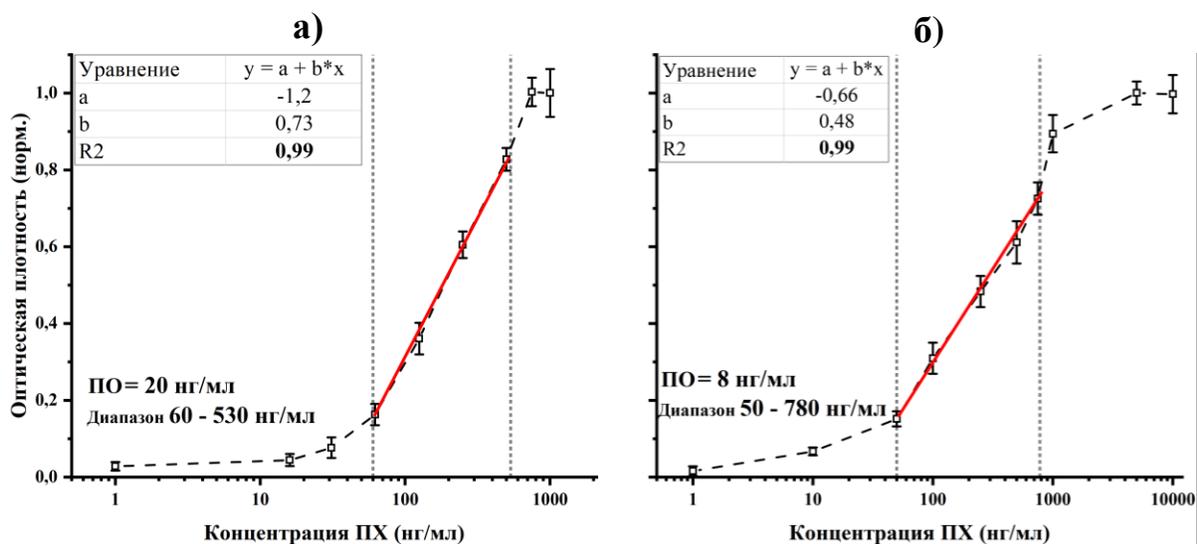
Рисунок 21. Влияние предварительной очистки (а), концентрации БСА в блокирующем буфере (б), температуры и времени иммобилизации молекулы шаблона (в) на сорбционные свойства эпМИП

Оптимальная температура инкубации ПХ при извлечении составила 37°C при этом сопоставимые результаты достигнуты при проведении сорбции в течение 60 (ИФ=2,53) и 120 (ИФ=2,56) минут. Незначительная разница в ИФ ( $\leq 10\%$ ), не превышает погрешности метода определения, в качестве оптимального времени инкубации выбрано 60. Полученные оптимальные параметры предварительной очистки эпМИП и извлечения ПХ в дальнейшем использованы для характеристики аналитических свойств полученных эпМИП ПУ и ПВП

Для определения аналитических характеристик определения ПХ с использованием эпМИП по представленной схеме (рис. 22) проводили иммобилизацию модельных растворов ПХ (1–10000 нг/мл, ФСБ) на

фрагменты эпМИП ПУ и ПВП. Градуировочная зависимость определения ПХ и соответствующий динамический диапазон представлены на рисунке X. Полученные результаты позволяют проводить определение ПХ в широком диапазоне концентраций с использованием эпМИП полученных как с использованием ПУ, так и с ПВП.

Изучена селективность полученных эпМИП. Извлечение ПХ проводили в оптимальных условиях из белковых смесей с постоянной концентрацией ПХ (1 мкг/мл) и варьируемой концентрацией мешающих белков овальбумин, БСА (1–1000 мкг/мл). Результаты представлены на рисунке 23.



эпМИП	ПО, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	ИФ
ПУ	20	60–530	2,5
ПВП	8	50–780	3,2

Рисунок 22. Градуировочная зависимость определения ПХ, на фрагментах эпМИП ПУ (а) и ПВП (б)

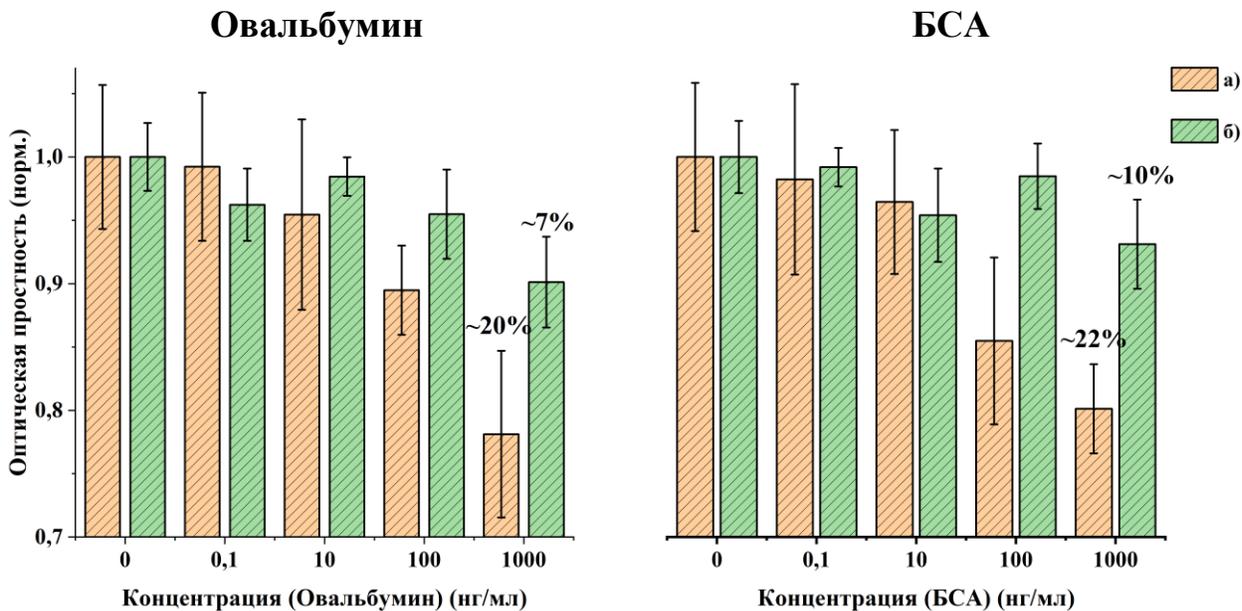


Рисунок 23. Селективность полученных эпМИП ПУ (а) и ПВП (б) при извлечении ПХ из белковой смеси

Установлено, что оптическая плотность раствора ТМБ, инкубированного на поверхности эпМИП после сорбции ПХ из белковых смесей, уменьшается при увеличении концентрации овальбумина и БСА. Это свидетельствует об извлечении этих белков одновременно с ПХ. При этом изменение оптической плотности (~10%) на эпМИП ПВП, значительно (~2 раза) меньше чем на эпМИП ПУ, что связано с сохранением структуры нановолокон и как следствие сайтов связывания и меньшей вероятностью неспецифической сорбции мешающих белков на поверхности полимерной матрицы. В то же время полученные данные могут свидетельствовать о низкой гомогенности материала эпМИП ПУ. Для проверки влияния этого фактора изучена гомогенность распределения сорбционных свойств на поверхности полученных эпМИП ПУ и ПВП. С этой целью получали материал, одновременно содержащий эпМИП и эпНИП, который в дальнейшем использовали для извлечения ПХ (1 мкг/мл). Гомогенность оценивали по изменению ИФ в зависимости от расположения фрагмента эпМИП и НИП на

исходном материале. На рисунке 24. представлена схема расположения фрагментов эпМИП и НИП на поверхности полученного материала и тепловые карты изменения ИФ в зависимости от расположения фрагмента.

Представленные результаты показывают, что материал эпМИП ПВП обладает большей воспроизводимостью сорбционных свойств ( $ИФ = 3,1 \pm 0,28$ ), по сравнению с эпМИП ПУ ( $ИФ = 2,35 \pm 0,42$ ). Эти данные подтверждают влияние структуры полимерной матрицы на воспроизводимость, селективность и гомогенность сорбционных свойств эпМИП.

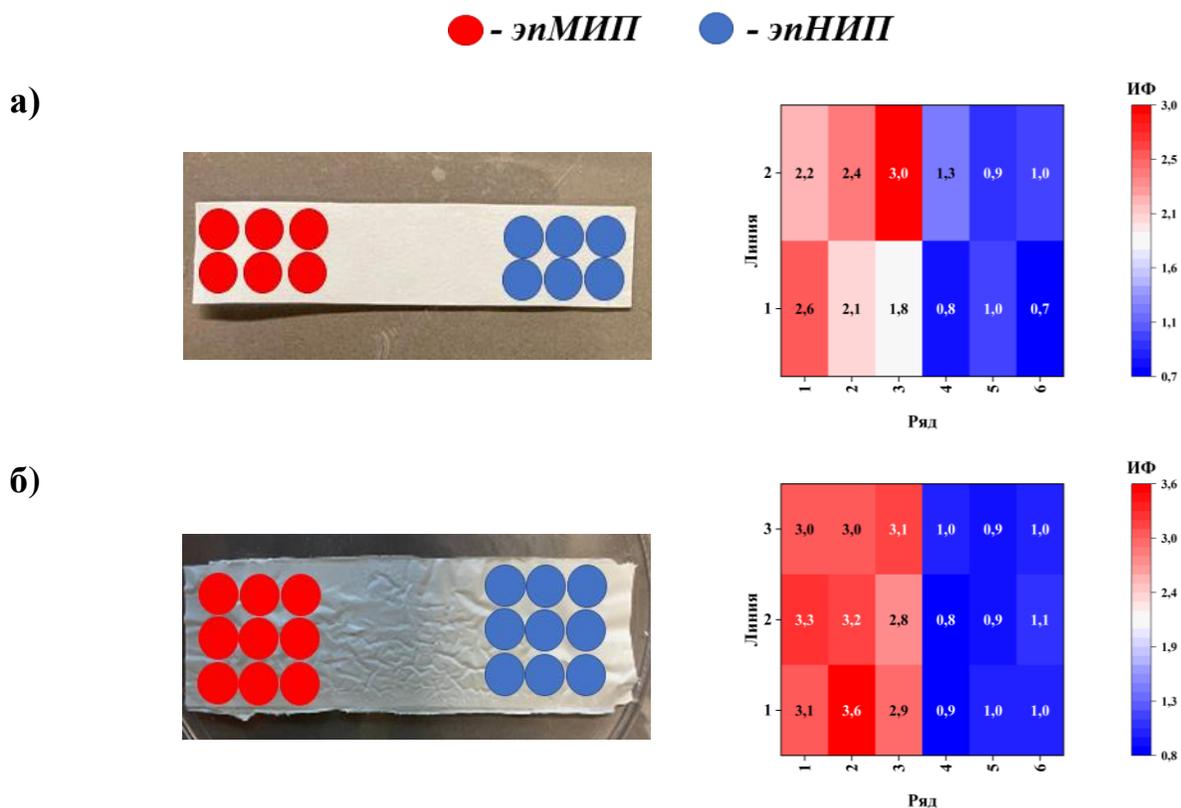


Рисунок 24. Гомогенность полученных материалов эпМИП ПУ (а) и ПВП (б), при извлечении ПХ

#### *Заключения по главе 4*

Таким образом, показана возможность применения образцов эпМИП ПУ ПВП для определения ПХ в динамических диапазонах 60–535; 50–780 нг/мл, и ПО 8; 20 нг/мл, соответственно. Показана специфичность извлечения ПХ на поверхность для фрагментов эпМИП ПУ (ИФ = 2,5) и ПВП (ИФ = 3,2). Материал эпМИП ПВП характеризуется высокой селективностью к белковым молекулам схожей и различной массы и площадью поверхности. В случае близких характеристик молекулы белка величина неспецифической сорбции составила 10%, при мольном соотношении овальбумин:ПХ равном 1000:1. В случае молекул с большей массой и площадью поверхности величина неспецифической сорбции составила 7%, при мольном соотношении БСА/ПХ 500:1. В то же время материал эпМИП ПВП, сохранивший нановолоконную структуру, характеризуется высокой гомогенностью и, как следствие, хорошей воспроизводимостью сорбционных свойств, что делает его перспективным для использования в качестве рецепторного элемента при разработке сенсорных систем для определения белковых молекул в биологических жидкостях и водных растворах.

## ГЛАВА 5. ИМПРИНТИНГ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Импринтинг (биоимпринтинг) белковых молекул – техника модификации структуры белковых молекул, которая применяется для усиления ферментативной активности и совершенствования технологических процессов, в частности при производстве биотоплив [140]. Общий принцип получения ИБ теоретически позволяет получать рецепторные элементы для извлечения целевых молекул различной природы. Однако большинство разработанных методик позволяют получать ИБ, проявляющих свойства только в органических средах. Что делает невозможным их применение для анализа целевых молекул в водных средах, а следовательно, для решения задач в области биохимии, медицины и контроля качества пищевых продуктов. Именно факт это ограничивает число работ по аналитическому применению ИБ.

В основном ИБ применяемые в аналитических целях получают методом, который впервые предложен для придания ферментативных свойств овальбумину [88]. Первое успешное аналитическое применение ИБ так же основано на импринтинге овальбумина, молекулой шаблоном являлся афлатоксин В1, а носителем – золотой электрод [86]. Достигнутые результаты показали возможность применения ИБ для решения аналитических задач. Однако применение золотого электрода в качестве носителя затрудняет внедрение таких сенсорных систем в широкую аналитическую и медицинскую практику.

В ходе выполнения работы изучена возможность применения ИБ в качестве рецепторного элемента на поверхности микропланшетов и стеклянных носителей (мультикаппиляров и МОВ) с использованием

стандартизированных протоколов, а также продемонстрирована возможность получения сорбентов для твердофазной экстракции на основе ИБ.

Основными задачами данной главы являлись:

- получение ИБ на основе БСА, овальбумина и ГО, специфичных к низкомолекулярным веществам (ЗЕА, 4-ГК, кумарин);
- изучение возможности модификации внутренней поверхности мультикапилляров и МОФ импринтированным овальбумином специфичным к ЗЕА;
- получение сорбента на основе НЧ  $\text{SiO}_2$  модифицированных импринтированной ГО специфичной к низкомолекулярным веществам (ЗЕА, 4-ГК, кумарин);
- получения ИБ на основе ГО специфичного к овальбумину и ПХ;
- оценка возможности применения ИБ для решения аналитических задач;
- изучение сорбционных свойств сорбента на основе НЧ  $\text{SiO}_2$  модифицированных импринтированной ГО.

### **5.1. Молекулы шаблоны**

Для получения ИБ, специфичных к низкомолекулярным молекулам, в качестве молекулы шаблона использовали ЗЕА. Благодаря схожей структуре с природными эстрогенами ЗЕА может вступать во взаимодействие с сайтами эстрогенных рецепторов клеток, приводящее к снижению уровня прогестерона и сывороточного тестостерона в кровотоке и возникновению клеточных изменений, бесплодия и гиперактивных эстрогенных нарушений [141]. На территории Российской Федерации уровни содержания ЗЕА

установлены для зерна, используемом для пищевых и кормовых целей [142], а также в продуктах питания на основе злаковых культур [143]. Описанные свойства ЗЕА ставят задачу разработки новых коммерчески доступных рецепторных элементов для его выделения и концентрирования из злаковых культур и продуктов питания.

При получении ИБ, специфичных к высокомолекулярным молекулам, в качестве молекулы шаблона использовали овальбумин. Выбор объекта связан с распространённостью аллергических реакций на продукты, содержащие белок куриного яйца [144]. Пороговое содержание овальбумина для возникновения аллергических реакций варьируется от 0,13 до 6,5 мг [145]. Несмотря на требование к обязательному указанию всех ингредиентов, входящих в состав продуктов, в некоторых случаях следовые количества белка могут попадать в продукты, не имеющие в своём составе овальбумин, что может приводить к потенциальному развитию IgE-опосредованных аллергических реакций: крапивнице, ангионевротическому отёку или анафилаксии [146]. Вследствие этого, овальбумин можно использовать как маркер для определения в пищевых продуктах следов яичного загрязнения.

## **5.2 Импринтинг белков**

Техника импринтинга белков состоит из четырёх основных этапов: изменение конформации в процессе протонирования аминокислотных остатков матричного белка, внесение молекулы шаблона и образование комплекса матричная молекула-молекула шаблон, стабилизация конформации матричной молекул сшивающим мономером, удаление молекул шаблона из полученных сайтов связывания (рис. 25).

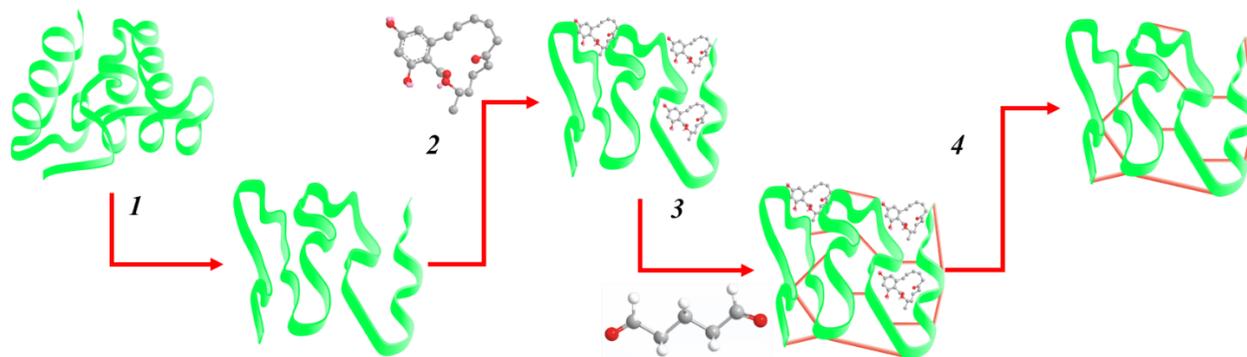


Рисунок 25. Схема получения ИБ [105]: протонирование аминокислотных остатков (1), образование комплекса матричная молекула-молекула шаблон (2), стабилизация конформации (3), очистка сайтов связывания (4)

Наибольшее влияние на сорбционные свойства ИБ оказывают выбор оптимальной матричной молекулы, определение оптимальной концентрации молекулы шаблона при синтезе и подбор наиболее эффективного метода очистки сайтов связывания от молекул шаблона после завершения импринтинга. Влияние этих параметров рассмотрено далее.

### 5.2.1 Выбор матричной белковой молекулы

Подбор матричной молекулы является ключевым этапом для успешного получения ИБ. В общем случае необходимо учитывать, что количество атомов, располагающихся в сайте связывания линейно зависит от площади сайта и, в среднем, на один атом приходится  $9,2 \text{ \AA}^2$  площади [96]. Таким образом определяющим фактором при выборе матричной молекулы является природа и площадь поверхности молекулы шаблона.

## Получение ИБ специфичных к ЗЕА

В случае низкомолекулярных молекул шаблонов в качестве матричных может применяться широкий диапазон белковых молекул [106]. При этом стоит учитывать гидрофобные свойства ЗЕА. Сродство сайта связывания и специфичность ИБ в случае ЗЕА будет в большей степени зависеть от гидрофобных и в меньшей степени электростатических взаимодействий. Электростатические эффекты в слабокислых средах могут оказывать негативное воздействие на эффективность взаимодействия молекулы шаблона с матричной молекулой на этапе образования сайта связывания.

Площадь поверхности матрицы также может оказывать значительное влияние на сорбционные свойства ИБ. Изучено влияние гидрофобности и площади поверхности матричной молекулы на сорбционные свойства ИБ, полученных по методике [86]. Для этого в качестве матричных белковых молекул использованы БСА ( $24 \text{ кÅ}^2$ ), овальбумин ( $13 \text{ кÅ}^2$ ) и гемоцианин из лимфы *Megathura crenulata* ( $1\,200 \text{ кÅ}^2$ ). Полученные ИБ и соответствующие им нИБ иммобилизовали ( $37^\circ\text{C}$ , 30 мин) на поверхности лунок микропланшета, после чего в лунки вносили раствор ЗЕА (50 нг/мл, ФСБ) и инкубировали при перемешивании в течение 3 часов. Концентрацию ЗЕА определяли по ЖХ МС/МС [104]. Степень извлечения рассчитывали, как разницу концентраций ЗЕА в растворе до и после сорбции на ИБ. На рисунке 26 представлены значения степени извлечения ЗЕА и рассчитанные значения ИФ для матричных молекул, использованных при синтезе.

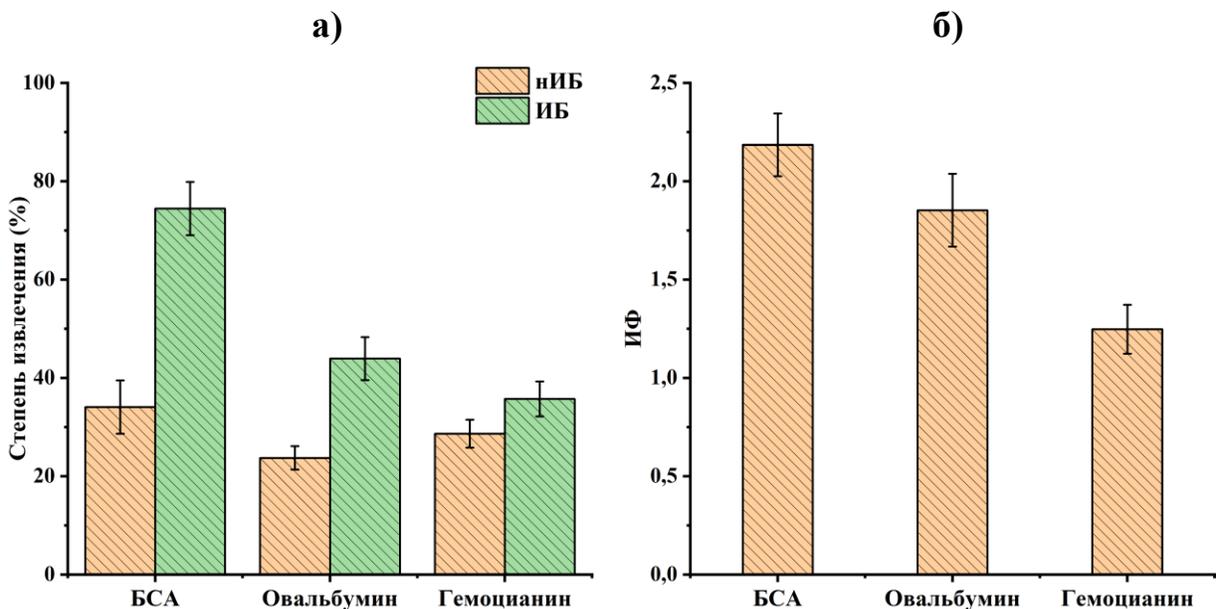


Рисунок 26. Влияние матричной молекулы на степень (а) и специфичность (б) извлечения ЗЕА из модельного раствора

Установлено, что на сорбционные характеристики ИБ, специфичных к ЗЕА оказывает влияние как гидрофобность, так и площадь поверхности белковой молекулы. Образцы ИБ на основе гемоцианина, характеризующегося наибольшей площадью поверхности среди выбранных матричных молекул, характеризовались наименьшими значениями специфичности (ИФ = 1,3) и степени извлечения ( $35 \pm 4\%$ ) ЗЕА. Это может быть связано как с устойчивостью конформации его развитой структуры и, как следствие, образованием малого количества сайтов связывания, так и со сложностью последующего удаления молекул шаблонов на этапе очистки. Овальбумин характеризовался низкими значениями степени извлечения ( $43 \pm 4\%$ ) ЗЕА, но достаточно высокой специфичностью (ИФ = 1,9). Наиболее высокие значения специфичности (ИФ = 2,2) и степени извлечения ( $74 \pm 5\%$ ) ЗЕА наблюдали в случае импринтированного БСА. Согласно [147] БСА характеризуется большей гидрофобностью чем овальбумин, что в сочетании с большей

площадью поверхности позволяет сформировать в его структуре большее количество сайтов связывания с более высоким сродством к молекуле шаблону.

### *Получение ИБ специфичных к овальбумину и ПХ*

При синтезе ИБ специфичных к высокомолекулярным молекулам, в частности белкам, ключевыми факторами, влияющими на возможность проведения импринтинга, являются соотношение размеров и площадей поверхности матричной белковой молекулы и молекулы шаблона.

Теоретический расчёт площади поверхности белковых молекул проводили для кристаллографических структур ГО (PDB ID: 1CF3), БСА (PDB ID: 4F5S), ПХ (PDB ID: 1W4W) и овальбумина (PDB ID: 1OVA) из базы данных Protein Data Bank [148]. Для визуализации и расчета площади (табл. 3) поверхности использовали программу Schödinger Suite 2018 (Schrödinger, Inc.).

Размеры белковых молекул (ГО, БСА, ПХ, овальбумина) определены методом ДРС в условиях образования комплекса матричная молекула-молекула шаблон (рН=3, 25 °С). Для этого использовали растворы белков (2 мг/мл) в HCl (рН=3). Результаты представлены на рисунке 27.

Таблица 3. Характеристики белковых молекул

<b>Белок</b>	<b>M<sub>r</sub>, кДа</b>	<b>Размер, нм</b>	<b>Площадь поверхности, кÅ<sup>2</sup></b>
ГО	160	12,9 ± 0,1	32
БСА	69	7,8 ± 0,2	24
ПХ	44	7,1±0,2	10
Овальбумин	45	5,9 ± 0,2	13

Согласно представленным, данным размер белков уменьшается в ряду ГО> БСА> ПХ> овальбумин, а площадь поверхности – ГО> БСА> овальбумин> ПХ. Наибольшая разница в размерах белковых молекул наблюдается для пары ГО:овальбумин ~2,2 раза, а по площади поверхности

для пар ГО:ПХ~3,2 раза и ГО:овальбумин~2.7 раза. Это предполагает перспективность использования ГО в качестве матричной молекулы для получения ИБ специфичных к ПХ и овальбумину.

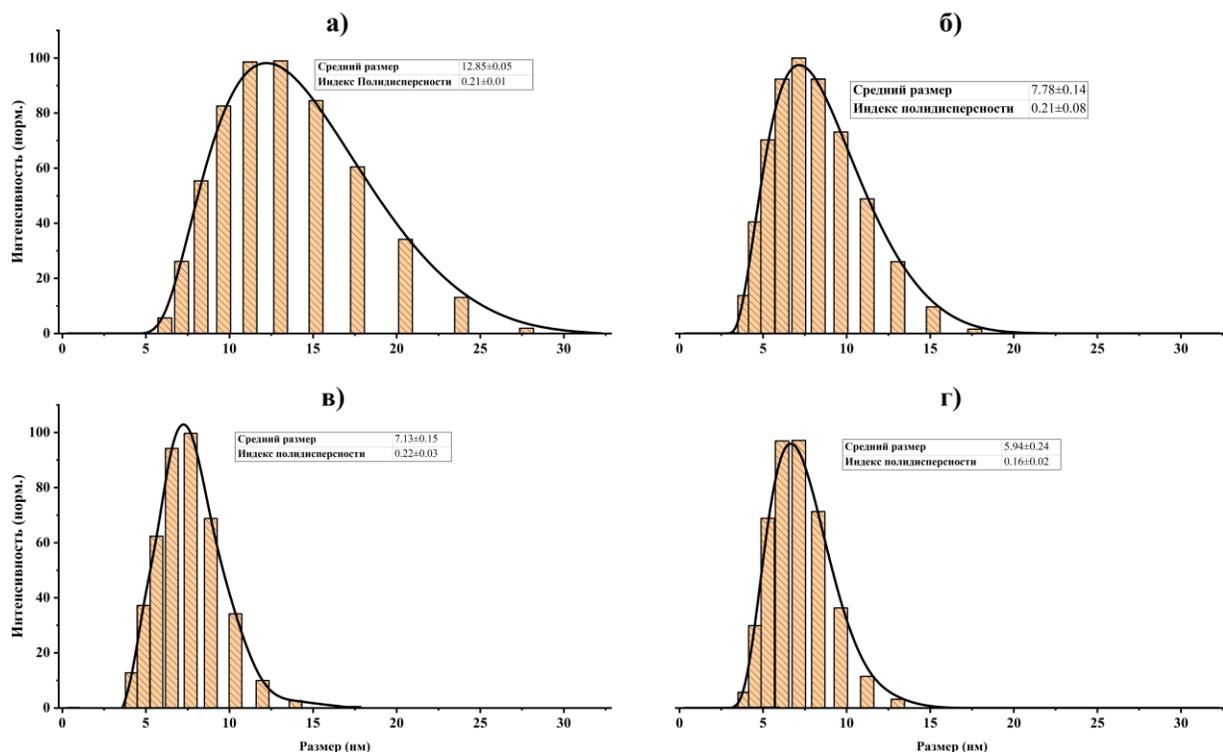


Рисунок 27. Размер ГО (а), БСА (б), ПХ (в) и овальбумина (г) определенный методом ДРС

### 5.2.2 Влияние концентрации молекулы шаблона при получении ИБ

Значительное влияние на сорбционные свойства ИБ оказывает концентрация молекулы шаблона на этапе образования комплекса при получении ИБ.

#### *Получение ИБ специфичных к ЗЕА*

В случае ИБ специфичных к ЗЕА оценивали влияние концентрации молекулы шаблона при синтезе на степень извлечения ЗЕА из модельного раствора (50 нг/мл). Степень извлечения оценивали как разность концентраций

исходного раствора ЗЕА и раствора после инкубации на лунках микропланшета с ИБ. Определение концентрации ЗЕА проводили методом ЖХ МС/МС. На рисунке 28а представлены результаты извлечения ЗЕА с использованием ИБ полученных при разных концентрациях молекул шаблон при синтезе

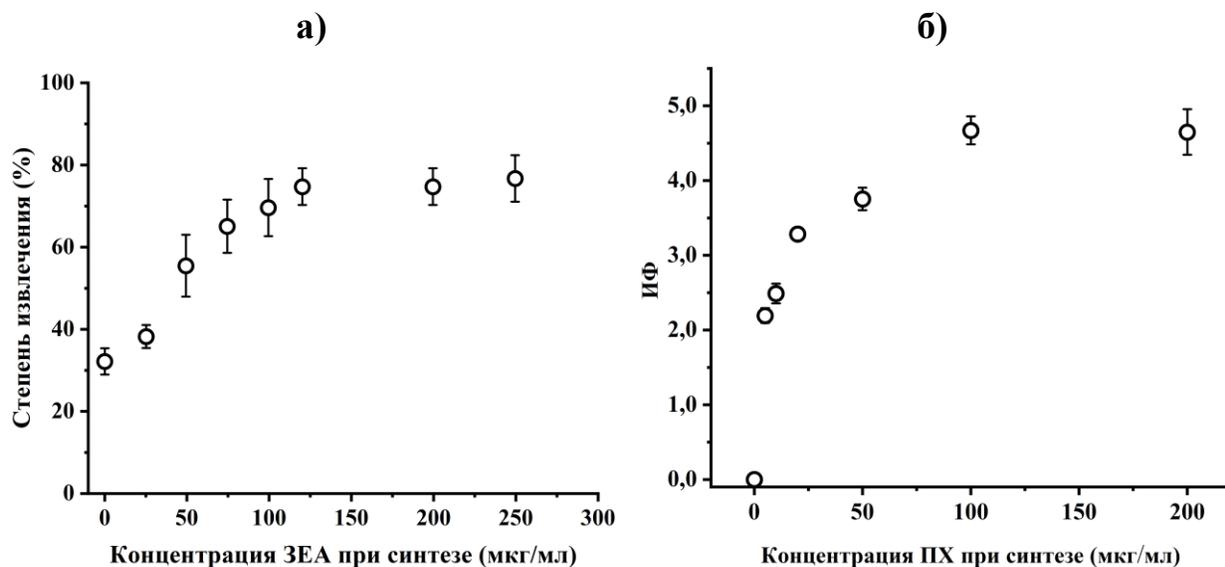


Рисунок 28. Влияние концентрации молекул шаблона при синтезе на степень извлечения ЗЕА (а) и селективность извлечения ПХ (б) из модельных растворов

Установлено, что в случае ЗЕА наибольшая степень извлечения достигается при использовании для раствора с концентрацией 120 мкг/мл. Увеличение концентрации ЗЕА не оказывает существенного влияния на эффективность извлечения из модельных растворов.

#### *Получение ИБ специфичных к овальбумину*

Изучено влияние концентрации раствора ПХ, при импринтинге ГО на сорбционные свойства ИБ. Для этого извлечение ПХ из модельного раствора (500 нг/мл) проводили ИБ специфичных к ПХ и нИБ, предварительно иммобилизированных на поверхности лунок микропланшета. Рассчитанные

значения специфичности извлечения ПХ использованы для оценки влияния концентрации молекулы шаблона на сорбционные свойства полученных ИБ (рисунке 28б). При получении ИБ специфичных к ПХ максимальная селективность извлечения ( $ИФ = 4,7$ ) достигается при использовании раствора ПХ с концентрацией 100 мкг/мл.

### ***5.2.3 Визуализация удаления молекул шаблонов при получении ИБ***

Правильный выбор оптимальных условий очистки сайтов связывания ИБ позволяет избегать ложноположительных результатов при последующем аналитическом применении ИБ. В зависимости от размера молекулы шаблона применяют различные методики очистки сайтов связывания после получения ИБ.

#### *Получение ИБ специфичных к ЗЕА*

Для низкомолекулярных молекул шаблонов предпочтительным является применение диализа [86,106,114], что обусловлено возможностью молекул шаблона свободно диффундировать в диализат из белковой матрицы. Важной задачей является поиск эффективного метода контроля удаления молекул шаблонов. Применение спектрофотометрии для решения этой задачи затрудняется возможным перекрыванием спектров поглощения матрицы и молекул шаблона, а также низким ПО. В случае флуоресцирующих веществ наиболее эффективным представляется использование флуоресцентной спектроскопии с регистрацией сигнала при разных длинах волн возбуждения (3D флуоресцентная спектроскопия). Для проведения контроля очистки спектры образцов импринтированной ГО, специфичной к ЗЕА, 4-ГК и кумарина регистрировали в процессе проведения диализа. На рисунке 29

представлены нормированные спектры флуоресценции ГО и ЗЕА, а также ИБ в процессе удаления ЗЕА диализом.

Показано, если положение максимума испускания молекул шаблона и белковой матрицы различаются больше чем на 50 нм, достаточным является регистрация флуоресцентного сигнала при одной или двух длинах волн возбуждения оптимальных для каждого из компонентов смеси. Использование флуоресцентной спектроскопии позволило впервые визуализировать удаление ЗЕА из ИБ во время проведения диализа. Установлено, что полная очистка импринтированной ГО от ЗЕА достигается проведением диализа раствора ИБ течение 24 часов. Диализ проводили с использованием в качестве диализата: ФСБ (рН=6.5, 400 мл/час, ~ 5 ч,) и ФСБ (рН=7.4, ~ 18 ч).

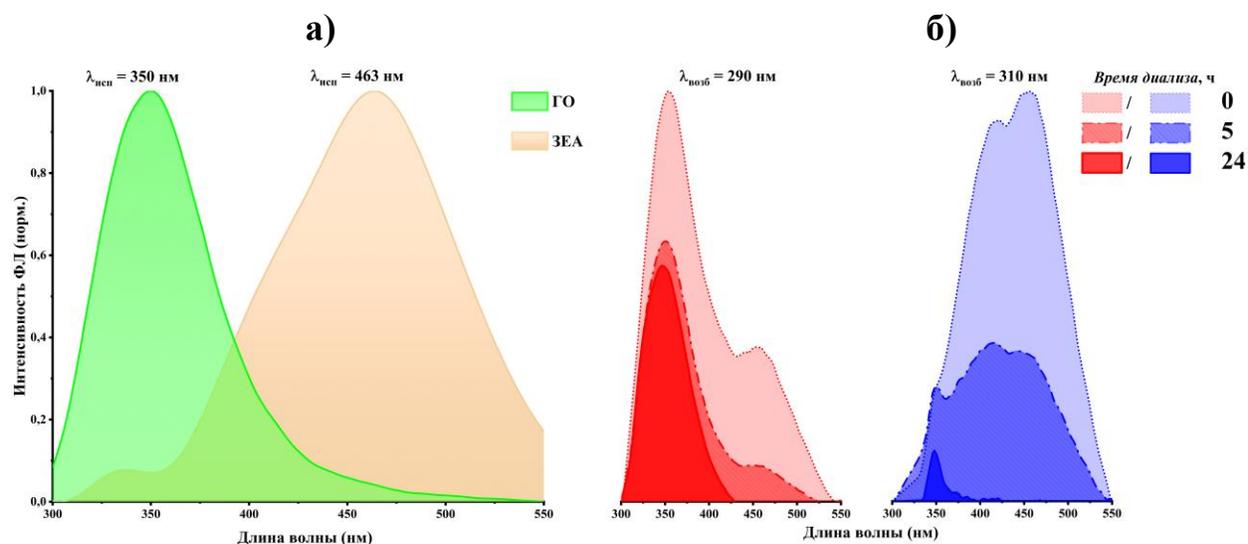


Рисунок 29. Нормированные спектры флуоресценции ГО и ЗЕА (а) и раствора ИБ при длине волны возбуждения 290 и 310 нм (б)

В случае молекул шаблонов с положением максимума флуоресценции близким к белковой молекуле предпочтительно использовать весь набор спектральных данных 3D флуоресцентной спектроскопии (длина волны возбуждения 240–330 нм). На рисунке 30 представлены проекции нормированных 3D спектров флуоресценции растворов импринтированной

ГО, специфичной к ЗЕА, 4-ГК, кумарину и нИБ, полученных при проведении диализа.

Визуализация данных в виде проекций позволяет значительно упростить интерпретацию результатов 3D флуоресцентной спектрометрии, провести одновременный анализ группы образцов. Положения максимумов флуоресценции всех полученных ИБ и нИБ совпадают после проведения диализа. В то же время на проекциях ИБ, специфичных к 4-ГК, можно детально наблюдать трансформацию положения максимума флуоресценции. Например, в растворе ИБ до очистки наблюдали максимум флуоресценции соответствующий 4-ГК (375 нм) при возбуждении в диапазоне 260–320 нм, а после очистки только максимум флуоресценции, соответствующий белку (350 нм) при возбуждении 280 нм.

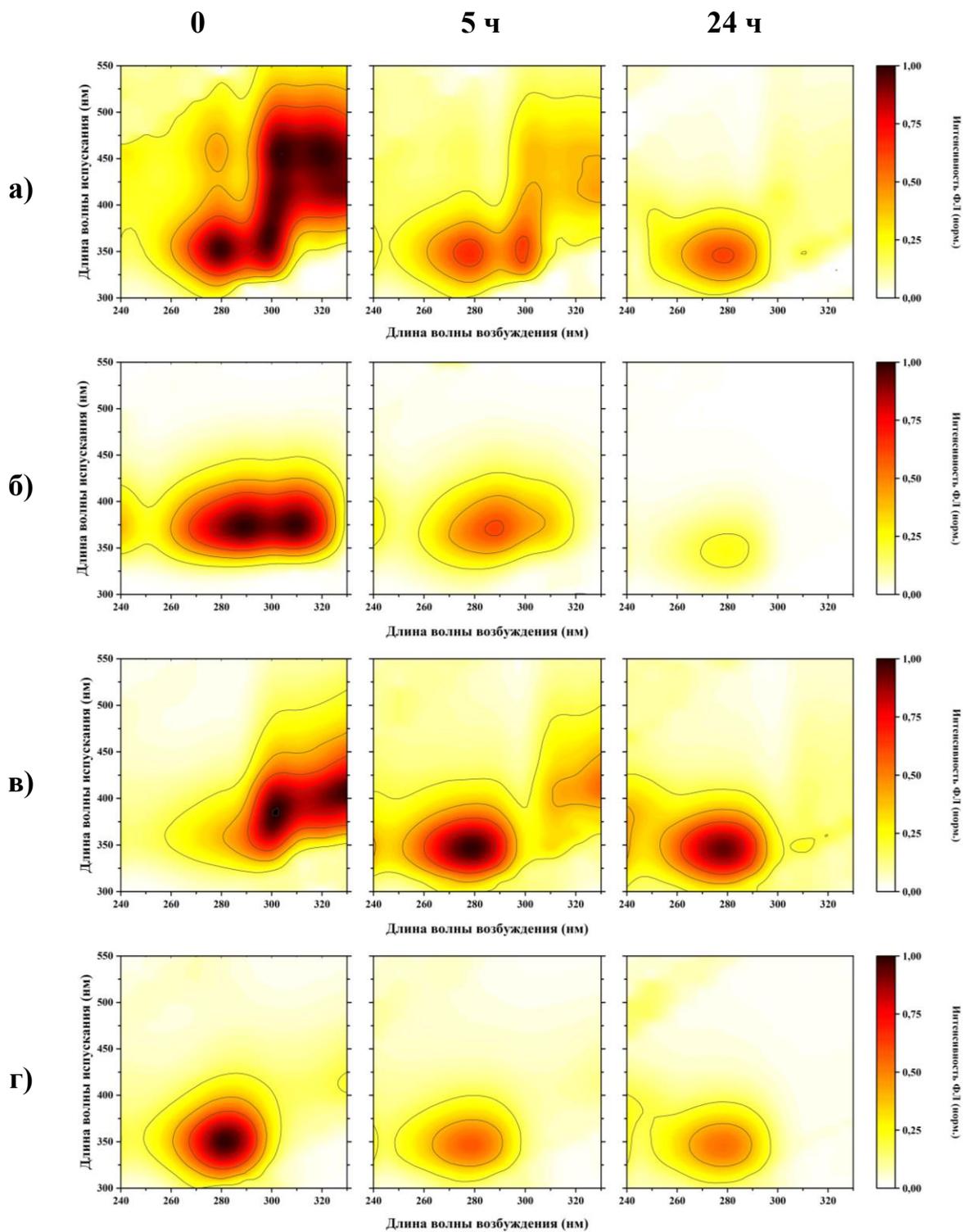


Рисунок 30. Влияние времени диализа на проекции 3D флуоресцентных спектров растворов ИБ, специфичных к ЗЕА (а), 4-ГК (б), кумарину (в) и НИБ (г)

## Получение ИБ специфичных к овальбумину

Сложность очистки ИБ от высокомолекулярных молекул шаблона заключается в низкой подвижности отдельных компонентов смеси и невозможности использования стандартного протокола диализа. Нами разработана двухстадийная комбинированная методика очистки импринтированной ГО от молекул ПХ и овальбумина. Метод заключается в последовательном проведении диализа (ФСБ, рН 6,5, 400/ч, ~5 ч) раствора ИБ и эксклюзионной хроматографии полученной смеси, разделяющей компоненты за счет разницы в подвижности и адсорбционной способности. На рисунке 31 представлена хроматограмма разделения смеси, содержащей ИБ и молекулы шаблона, после проведения диализа.

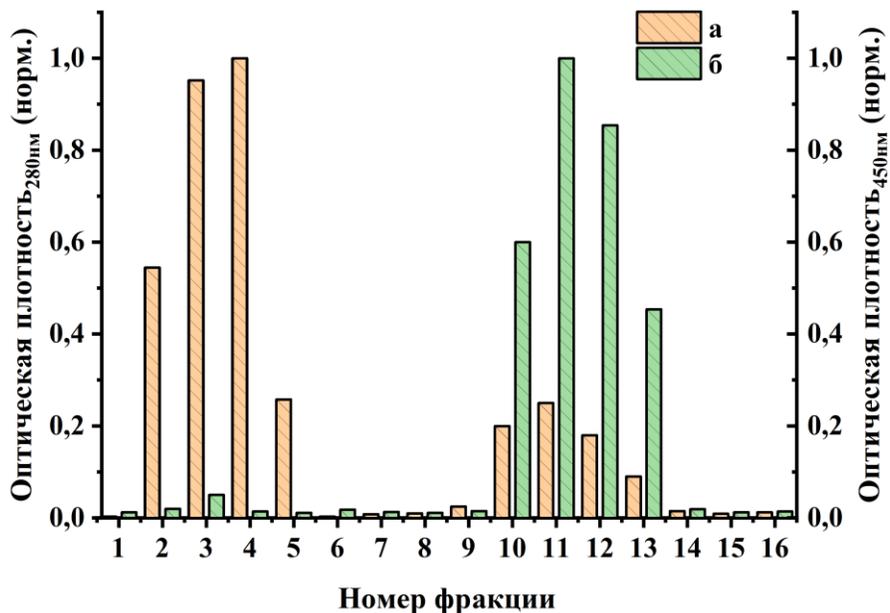


Рисунок 31. Хроматографический профиль, разделения на Sephadex™ G-75, диализированного раствора ИБ при 280 нм до (а) и 450 нм после (б) реакции с ТМБ

Полученные фракции изучены спектрофотометрическим методом при 280 нм и 450 нм до и после реакции с ТМБ. Две группы фракций (2–5; 10–13) содержат белковые молекулы. Характерный максимум поглощения

окисленной формы ТМБ (450 нм) наблюдали для фракций 10–13. Таким образом, фракции 2–5 содержали очищенный ИБ, фракции 10–13 – молекулы шаблона. Результаты показывают эффективность предложенной методики для удаления высокомолекулярных молекул шаблона из сайтов связывания ИБ.

#### 5.2.4 Выбор метода получения

Техника импринтинга белков позволяет получать как ИБ в растворе (получение в «пробирке»), так и создавать слой ИБ непосредственно на поверхности носителя (*in-situ*).

##### Получение *in-situ* ИБ на поверхности микропланшета

В случае импринтированного БСА в качестве носителя применяли микропланшет. После формирования *in-situ* ИБ, проводили оценку их сорбционных свойств. Для этого в модифицированные *in-situ* ИБ лунки микропланшета вносили раствор ЗЕА (50 нг/мл, ФСБ, рН = 7,4), инкубировали в течение 3 ч и проводили расчет степени извлечения с использованием ЖХ МС/МС (рис. 32).

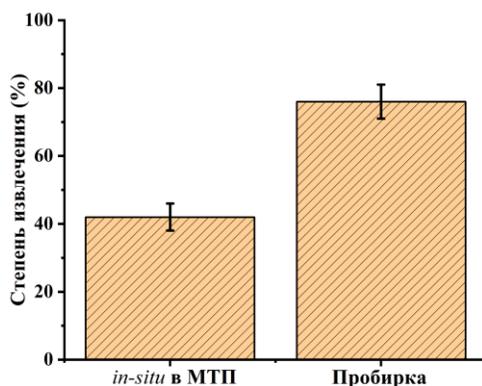


Рисунок 32. Степень извлечения ЗЕА из модельного раствора ИБ, полученными *in-situ* и в «пробирке»

Получение *in-situ* ИБ позволяет сократить время извлечения ЗЕА за счет исключения стадии иммобилизации рецептора. В то же время степень

извлечения ЗЕА на поверхность лунок модифицированных *in-situ* ИБ меньше (42%), чем при использовании ИБ, полученных в «пробирке» (76%). Полученные данные использованы для проведения *in-situ* ИБ на поверхности поликапиллярных систем

#### *Получение in-situ ИБ на поверхности поликапиллярных систем*

В случае импринтированного овальбумина в качестве носителя применяли стеклянные поликапиллярные системы. Стекло, материал, используемый для производства поликапиллярных систем, обладает низкой сорбционной емкостью по сравнению с поверхностью сорбирующего микропланшета. В связи с этим для получения *in-situ* ИБ на поликапиллярных системах проводили предварительную функционализацию внутренней поверхности с использованием поли-L-лизина.

Известно [122], что спектры пропускания МОВ с полую сердцевинной характеризуются высокой чувствительностью к изменению толщины поверхности стеклянных капилляров, образующих полую сердцевину. Оценено влияние стадий модификации внутренней поверхности для извлечения конъюгата ЗЕА-ПХ (20 нг/мл) на спектры пропускания МОВ. На рисунке 33, представлены спектры пропускания (650–750 нм) образцов МОВ после модификации внутренней поверхности *in-situ* ИБ и нИБ. После извлечения ЗЕА-ПХ из раствора образцы МОВ заполняли ТМБ субстратом и инкубировали в течение 5 минут. Спектры образцов МОВ, заполненных ТМБ субстратом, регистрировали режиме реального времени.

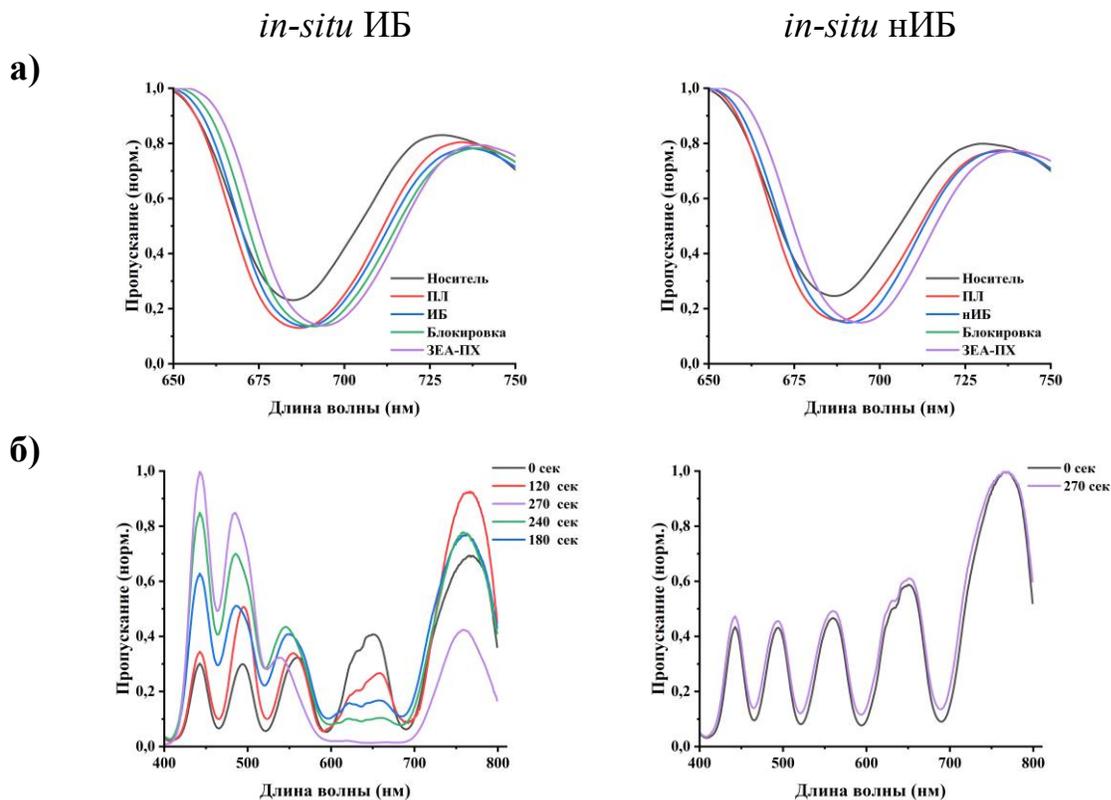


Рисунок 33. Спектры поглощения образцов МОВ, модифицированных *in-situ* ИБ и НИБ, до (а) и после (б) внесения ТМБ субстрата.

Установлено, что спектры пропускания образцов МОВ, модифицированных *in-situ* ИБ, характеризовались изменением положения максимума поглощения ( $\Delta\lambda=3 \pm 0,5$  нм) после извлечения конъюгата ЗЕА-ПХ. Положения максимума поглощения образцов модифицированных *in-situ* НИБ не изменялись после иммобилизации раствора ЗЕА-ПХ. Установлено, что после заполнения образцов ТМБ субстратом, изменение оптической плотности в диапазоне 600–700 нм, характерно только для образцов, модифицированных *in-situ* ИБ. Это свидетельствует о связывании ЗЕА-ПХ *in-situ* ИБ на поверхности МОВ.

### **5.3 Аналитические характеристики ИБ, специфичных к ЗЕА**

ИБ на основе БСА, овальбумина и ГО использованы для определения ЗЕА в формате конкурентного анализа. Основными стадиями конкурентного анализа являются: условия иммобилизации и концентрация рецепторных молекул, концентрация меченого анализита, концентрация и тип блокирующего буфера.

#### **5.3.1 Импринтинг БСА**

Изучено влияние буферных растворов используемых при иммобилизации ИБ в микропланшете на эффективность определения ЗЕА в формате конкурентного анализа. Установлено, что аналитические характеристики определения ЗЕА в модельных растворах сопоставимы при использовании ацетатного (рН = 4,1), ФСБ (рН = 7,4) и карбонатного (рН = 9,6) буферных растворов. В дальнейшем для приготовления растворов ИБ применялся карбонатный буферный раствор.

Чувствительность и селективность методик в иммуноанализе в основном зависит от специфичности и концентрации рецепторного элемента на поверхности носителя [105]. При проведении конкурентного определения меньшее количество рецепторного элемента приводит к увеличению чувствительности. Это обусловлено меньшим количеством доступных сайтов связывания для взаимодействия с целевыми молекулами и их конъюгатами.

В связи с этим изучено влияние разбавления растворов ИБ (1/2, 1/5, 1/10, 1/25) на чувствительность определения ЗЕА. Несмотря на то, что уменьшение концентрации ИБ увеличило чувствительность, анализ с использованием ИБ (1/25) характеризовался большим количеством ложноположительных результатов за счет уменьшения интенсивности окраски образцов не

содержавших ЗЕА. Оценку влияния разбавления ИБ проводили одновременно с выбором оптимального разведения конъюгата ЗЕА-ПХ (1/25000; 1/50000; 1/100000; К, 1/200000). Оптимальные результаты получены при использовании разведений ИБ (1/10) и ЗЕА-ПХ (1/100000).

Изучено влияние блокирующих буферных растворов на основе ФСБ (рН = 7,4) с добавлением казеина (0,1; 0,5; 0,75; 1% масс.) или обезжиренного молока (1, 2, 3, 5% масс.). При использовании блокирующих буферных растворов казеина (1% масс.) и обезжиренного молока (3, 5 % масс.) наблюдали увеличение ложно отрицательных результатов при определении ЗЕА. Это связано с увеличением неспецифической адсорбции ЗЕА-ПХ на поверхности блокирующего белка. Увеличение ложноотрицательных результатов происходило при использовании блокирующих буферных растворов с низкой концентрацией казеина (0,1; 0,5 % масс.) или обезжиренного молока (1, 2 % масс.). Лучшие результаты получены при использовании раствора ФСБ, содержащего казеин (0,75 % масс.).

Оценены аналитические характеристики определения ЗЕА в модельных растворах с использованием полученных ИБ. На рисунке 34а представлена градуировочная зависимость определения ЗЕА в модельных растворах (ФСБ, рН = 7,4) с использованием импринтированного БСА. Линейный диапазон определения ЗЕА в модельных растворах составил от 8–260 нг/мл с ПО 4,1 нг/мл (82 мкг/кг).

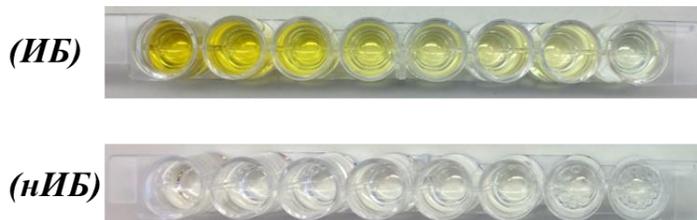
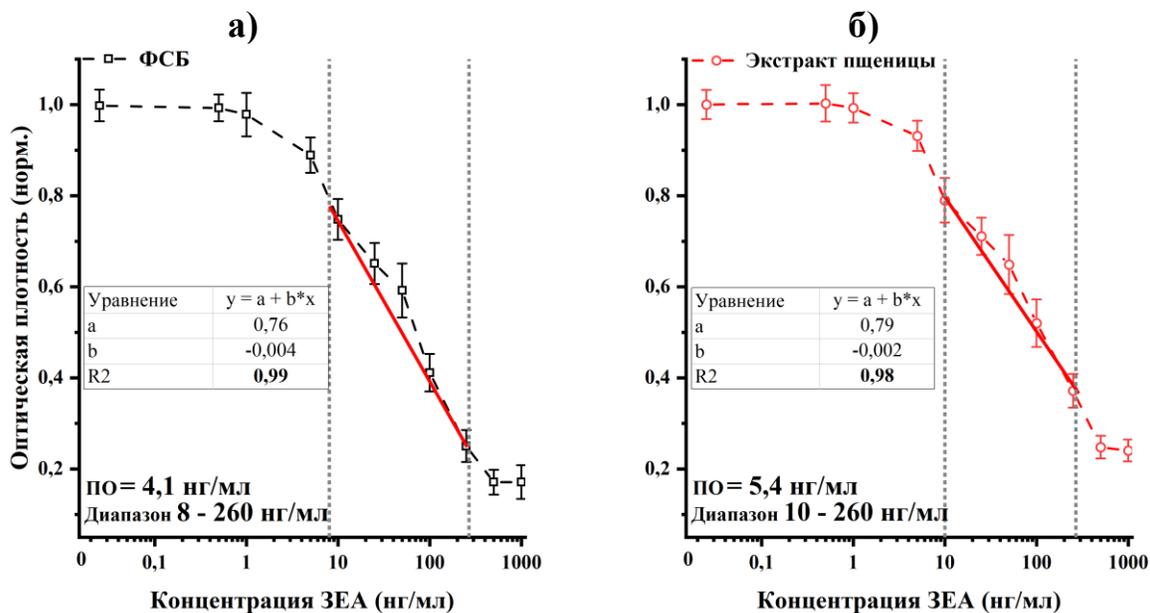


Рисунок 34. Градуировочные зависимости определения ЗЕА в модельных растворах (а) и искусственно загрязнённом экстракте пшеницы (б). Общий вид лунок микропланшета после проведения определения (в)

Изучено влияние матричного эффекта экстракта пшеницы на определение ЗЕА. Для этого растворы ЗЕА готовили с использованием экстракта (метанол / вода 70:30), чистой пшеницы [149–151]. Отсутствие ЗЕА в экстракте подтверждено методом ЖХ МС/МС. Линейный диапазон определения ЗЕА в образцах экстракта аналогичен полученному для модельных растворов (рис. 34б). ПО незначительно увеличился и составил 5,4 нг/мл (108 мкг/мл).

Изучена стабильность во времени полученных ИБ. С этой целью приводили анализ искусственно загрязненного ЗЕА (5 нг/мл) экстракта

пшеницы в течение 5 дней (n=20). Выбор концентрации ЗЕА определялся ПО для конкурентного определения целевой молекулы в образцах экстракта и максимально допустимым содержанием ЗЕА в зерне различного назначения по законодательству. Стандартное отклонение определения ЗЕА составило 5,2 %. Таким образом, ПО конкурентного определения ЗЕА сопоставим с коммерчески доступными иммунохимическими тест системами: 10 нг/мл (Helica Biosystems, США), 0-10 нг/мл (Sigma Aldrich, Бельгия), 5 нг/мл (Demeditec Diagnostics GmbH, Германия) и ниже чем 0,2 нг/мл (Cepham Life Sciences, Inc, США). Полученные результаты соответствуют максимально допустимому уровню ЗЕА в зерне различного назначения и продуктах питания (100 мкг/кг), установленному законодательством Российской Федерации [142,143].

Изучена селективность полученных ИБ к структурно близким микотоксинам ( $\alpha$ -зеараленол,  $\beta$ -зеараленол и зеараланон) и отличным по строению соединениям (охратоксин А, афлатоксин В1 и фумонизин) (рис. 35).

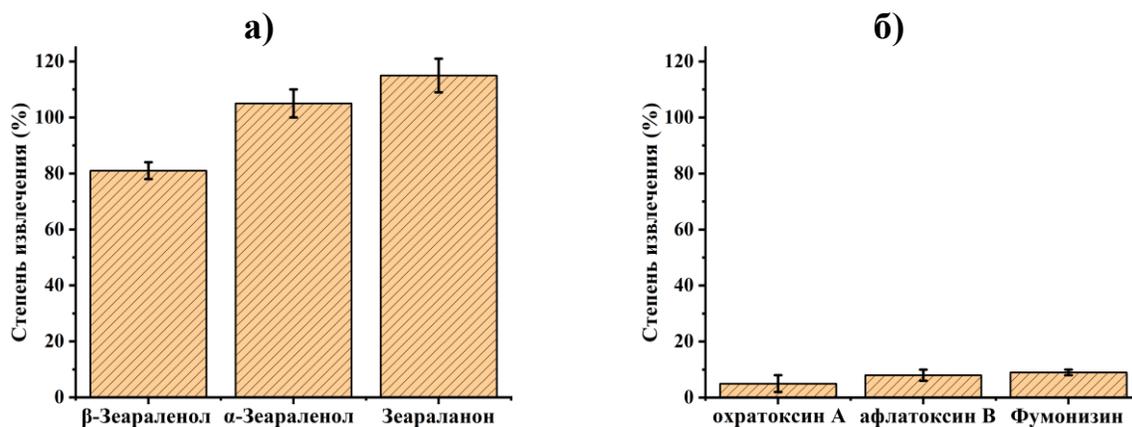


Рисунок 35. Степень извлечения структурно близких (а) и отличных по строению (б) с ЗЕА микотоксинов на ИБ

Установлено, что сайты связывания полученных ИБ характеризовались низким сродством (<10%) к молекулам отличным по строению и высоким (81–115%) по отношению к молекулам близким по строению к ЗЕА.

Представленный конкурентный анализ на основе ИБ использован для определения ЗЕА в 12 естественно загрязненных образцах злаковых культур (8 образцах пшеницы и 4 - кукурузы). Для предотвращения ложноотрицательных результатов, связанных с матричным эффектом, проводили определение ЗЕА в образцах до и после введения добавки (100 мкг/кг) концентрации ЗЕА. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты определения содержания ЗЕА в образцах злаков (n=3)

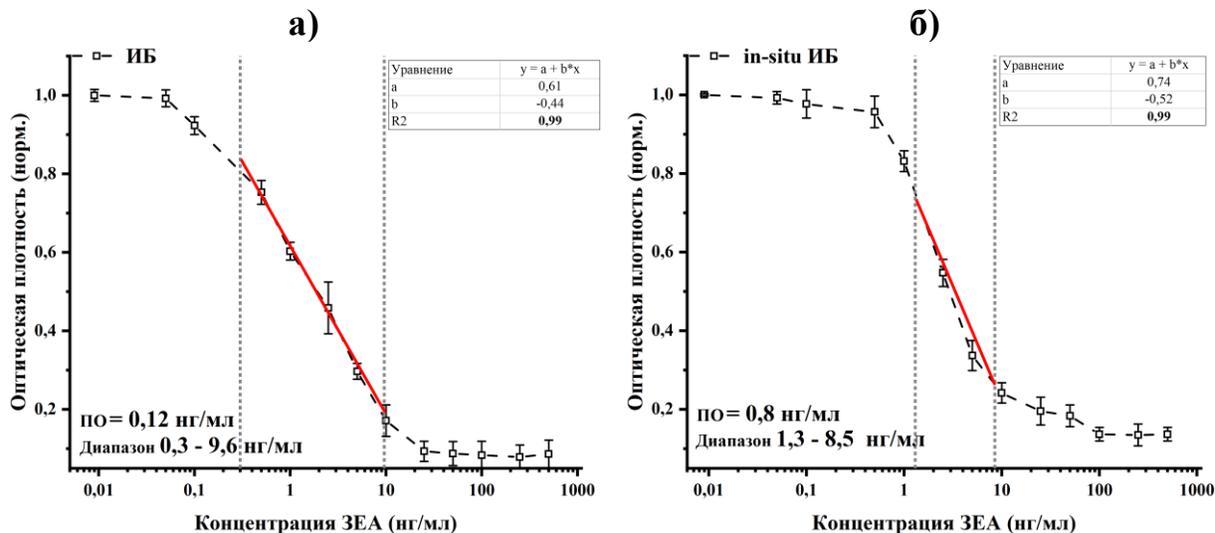
Образец	Конкурентный анализ на ИБ, (мкг/кг)			ЖХ МС/МС, (мкг/кг)
	Найдено	Найдено после добавления 100 мкг/кг	Степень извлечения (%)	Найдено
1	<ПО	135	111	21
2	125	236	108	118
3	109	213	109	95
4	<ПО	154	110	39
5	<ПО	147	96	52
6	122	245	102	138
7	<ПО	131	103	26
8	<ПО	144	109	31
9	<ПО	116	92	25
10	119	228	108	110
11	<ПО	176	107	63
12	<ПО	149	96	55

Результаты определения ЗЕА, полученные при использовании разработанной методики на основе ИБ, хорошо коррелируют с результатами

ЖХ МС/МС. Среди представленных образцов обнаружены 2 образца пшеницы и 1 кукурузы, в которых содержание ЗЕА превышает допустимые значения.

### 5.3.2 Импринтированный овальбумин

Интерес представляет сравнение аналитических свойств ИБ полученных *in-situ* и в пробирке. В ходе выполнения исследования проведено сравнение двух методов конкурентного определения ЗЕА с использованием в качестве носителя мультикапилляра. В первом случае ИБ, полученные в «пробирке», иммобилизовали на поверхности мультикапилляра а во втором использовали образцы мультикапилляров модифицированные *in-situ* ИБ. Для проведения определения ЗЕА в конкурентном формате, использованы оптимальные параметры, полученные ранее на микропланшете (раздел 5.3.1). На рисунке 36. представлены градуировочные зависимости определения ЗЕА двумя методами.



ИБ	ПО, мг/мл	ПО, мкг/кг	Линейный диапазон, мг/мл
в «пробирке»	0,12	2,4	0,3–9,6
<i>in-situ</i>	0,8	16	1,3–8,5

Рисунок 36. Градуировочные зависимости определения ЗЕА в модельных растворах с использованием мультикапилляров модифицированных ИБ, полученных в «пробирке» (а) и *in-situ* (б).

Установлено, что ИБ, полученные в «пробирке», позволили снизить ПО определения ЗЕА в 10 раз, что соответствует уровню коммерчески доступных иммунохимических тест систем (0,2 нг/мл, Serpham Life Sciences, Inc, США). В то же время *in-situ* ИБ представляют интерес в плане более быстрого проведения анализа.

Изучена селективность полученных ИБ к микотоксинам, характеризующимся сходной ( $\alpha$ -зеараленол,  $\beta$ -зеараленол и зеараланон) и отличной (охратоксин А, афлатоксин В1, фумонизин и vomitоксин) структурой с ЗЕА. При определении молекул схожих по строению в модельном растворе (1 нг/мл) получены результаты аналогичные определению ЗЕА, что указывает на групповую специфичность сайтов связывания ИБ. По отношению к другим группам микотоксинов ИБ характеризовались высокой специфичностью - степень извлечения ЗЕА в присутствии vomитоксина, составила 78 и 80 % для *in-situ* ИБ и полученных в «пробирке», соответственно. Полученные результаты полностью соответствует данным для БСА (раздел 5.3.1).

Определённый интерес представляет изучение специфичности сайтов связывания по отношению к конъюгатам, используемым в конкурентном формате определения ЗЕА. Оценку неспецифического связывания растворов конъюгатов ЗЕН (0–50 нг/мл) и vomитоксин–ПХ (0–100 нг/мл) проводили в мультикапиллярах, модифицированных ИБ. На рисунке 37 представлены значения оптической плотности ТМБ после инкубации (5 мин) на поверхности мультикапилляров, модифицированных ИБ.

Показано, что конъюгат ЗЕА-ПХ в отличие от vomитоксин-ПХ взаимодействует с поверхностью мультикапилляра, модифицированного ИБ. Результаты свидетельствуют о специфичности сайтов связывания ИБ к возможным сопутствующим при определении ЗЕА микотоксинам, а также к их конъюгатам.

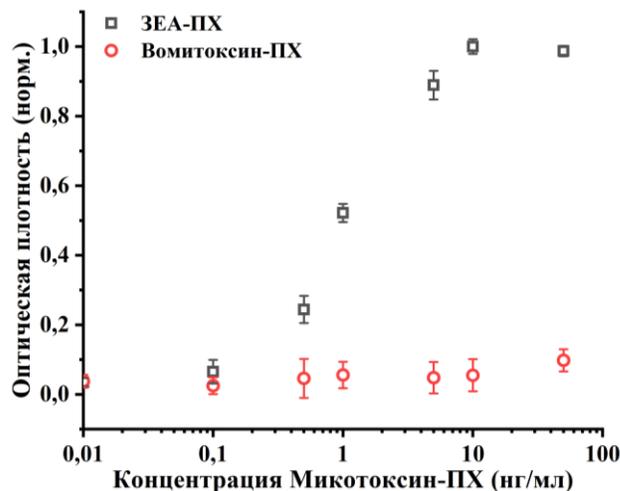


Рисунок 37. Оптическая плотность ТМБ (450 нм) после извлечения конъюгатов ЗЕА (а) и вомиотоксин-ПХ из модельных растворов на поверхность мультикапилляров, модифицированных ИБ

Представленный конкурентный анализ на основе мультикапилляров модифицированных ИБ использован для определения ЗЕА в 3 искусственно загрязненных образцах пшеницы методом введено найдено (табл. 5). Образцы чистого экстракта пшеницы искусственно загрязняли ЗЕА (100, 125, 150 мкг/кг) на уровнях, соответствующих требованиям законодательства РФ.

Таблица 5. Результаты определения содержания ЗЕА в образцах экстракта пшеницы (n=3)

<i>Введено (мкг/кг)</i>	<i>Найдено (мкг/кг)</i>	<i>Степень извлечения (%)</i>	<i>S<sub>r</sub></i>
100	112	112	8.5
125	111	88	9.6
150	161	107	9.4

Результаты определения ЗЕА (88–112 %), полученные с помощью разработанной методики на основе мультикапилляров, модифицированных ИБ, хорошо согласуются с внесенной концентрацией ЗЕА ( $S_r \leq 10\%$ ) в анализируемые образцы.

### 5.3.2 Импринтированная ГО

Применение токсичных молекул шаблонов, в частности ЗЕА ( $LD_{50} = 5$  мг/кг) при получении МИП требует обеспечения мер безопасности для лабораторного персонала, значительно увеличивает стоимость конечного продукта и не отвечает задачам «зеленой» химии. В связи с этим нами изучена возможность замены ЗЕА на его структурные аналоги (4-ГК и кумарин) при получении ИБ. На рисунке 38. представлены структурные фрагменты 4-ГК и кумарина в структуре

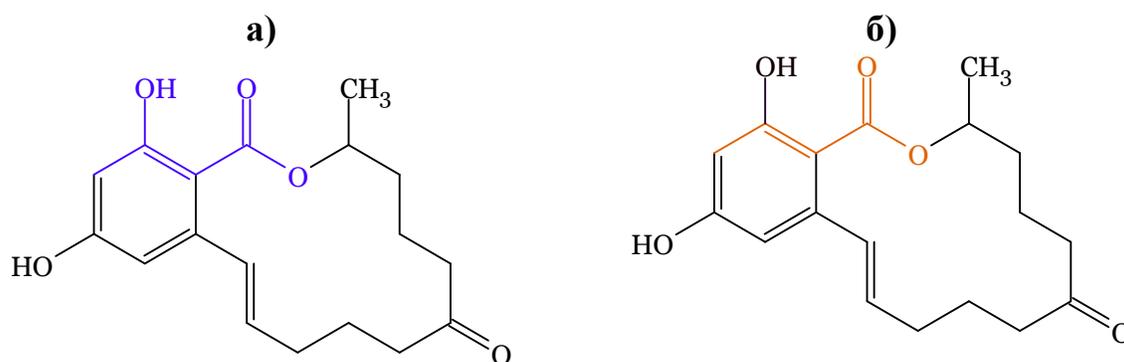
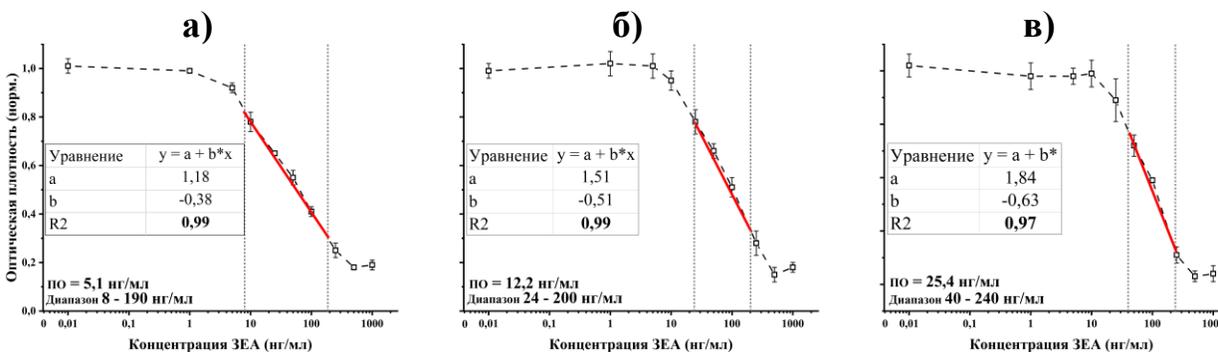


Рисунок 38. Структурные фрагменты 4-ГК (а) и КУ (б), присутствующие в структуре ЗЕА

Получение ИБ, проводили аналогично описанному в разделе 2.2.7. Изучена возможность применения ИБ, синтезированных с использованием структурных аналогов ЗЕА, для его определения в модельных растворах (ФСБ). Для проведения определения ЗЕА в конкурентном формате, использованы оптимальные параметры, полученные ранее на микропланшете (раздел 5.2.1).



Молекула шаблона	ПО, МГ/МЛ	ПО, МКГ/КГ	Линейный диапазон, МГ/МЛ
ЗЕА	5,1	102	8-190
4-ГК	12,2	244	24-200
Зеараленон	25,4	508	54-240

Рисунок 39. Градуировочные зависимости определения ЗЕА в модельных растворах с использованием ИБ, полученных в присутствии ЗЕА (а), 4-ГК (б) и кумарина (в)

Аналитические характеристики ИБ, полученных в присутствии структурных аналогов ЗЕА, показывают возможность их применения для определения ЗЕА в зерне различного назначения и продуктах питания (при молекула шаблон ЗЕА) и для контроля содержания ЗЕА в зерне, предназначенном для кормовых и пищевых целей (молекула-шаблон 4-ГК и кумарина), на уровнях, рекомендуемых в Российской Федерации [142].

#### *Сорбент на основе НЧ SiO<sub>2</sub>, модифицированных ИБ*

Изучена возможность создания сорбента на основе коммерческих НЧ SiO<sub>2</sub>, модифицированных ИБ. Для улучшения адсорбции ИБ на поверхности НЧ SiO<sub>2</sub> проведена их предварительная модификация ПАНИ (ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub>). Проведена оценка степени извлечения ЗЕА из модельного раствора (50 мкг/мл, ФСБ) твердофазной экстракцией с использованием НЧ SiO<sub>2</sub> и ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub>, модифицированных ИБ, полученных в присутствии ЗЕА, 4-ГК и кумарина. Для определения концентрации ЗЕА использовали ВЭЖХ/УФ.

На рисунке 40. представлены значения степени извлечения ЗЕА с использованием полученных сорбентов.

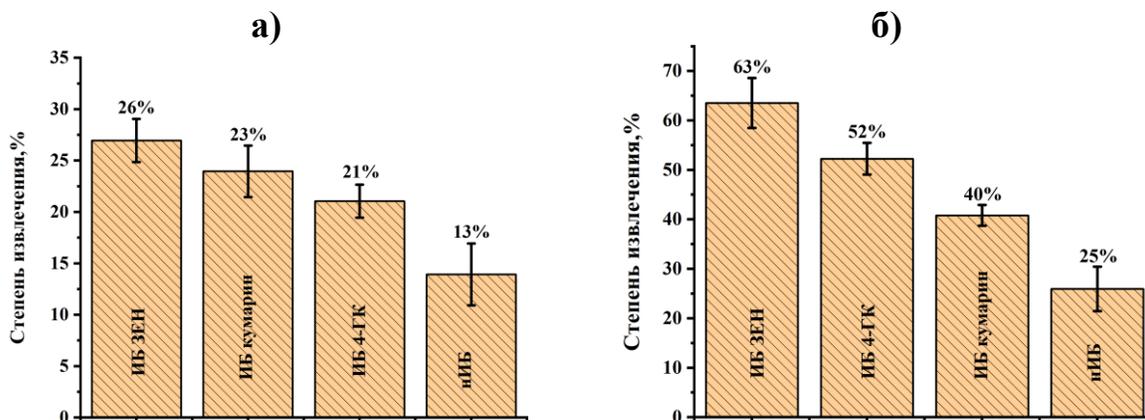


Рисунок 40. Степень извлечения ЗЕА из модельных растворов с использованием сорбентов на основе НЧ SiO<sub>2</sub> (а) и ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub> (б), модифицированных ИБ

Установлено, что модификация сорбента ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub> с использованием ИБ, позволяет увеличить сорбционную емкость носителя до 63%. Молекулы шаблона, использованные при получении ИБ, оказывают влияние на специфичность сорбента. Наибольшая специфичность достигнута при использовании ЗЕА (ИФ=2,4). Однако результаты, полученные для ИБ, синтезированного в присутствии 4-ГК (ИФ = 2,0), свидетельствуют о возможности замены молекул шаблонов микотоксинов на их менее токсичные аналоги с небольшими потерями аналитических характеристик.

#### 5.4 Аналитические характеристики ИБ, специфичных к высокомолекулярным молекулам шаблонам

ИБ на основе ГО использовали для определения овальбумина в формате конкурентного анализа. Оптимизацию условия определения белковых молекул в модельных растворах проводили с использованием ИБ, специфичных к ПХ.

Изучена возможность и специфичность извлечения ПХ из модельных растворов (80–2500 нг/мл). ИБ специфичные к ПХ иммобилизовали на поверхности лунок микропланшетов в течение 60 минут, затем поверхность обрабатывали блокирующим буферным раствором на основе ФСБ с добавлением казеина (2% масс.). Инкубацию ПХ (13,4 мкг/мл, ФСБ) на поверхности ИБ проводили в течение 3 часов. Для определения ПХ, связанной с ИБ, в лунки микропланшета вносили раствор ТМБ субстрата на 5 минут, остановку хромогенной реакции проводили раствором  $H_2SO_4$  (5% об.) На рисунке 41а, представлена зависимость оптической плотности ТМБ субстрата после инкубации на поверхности ИБ и нИБ. Изучено влияние природы метки конъюгата (овальбумин-ПХ, овальбумин-ФИТЦ), на эффективность его извлечения с помощью ИБ (рис. 41б).

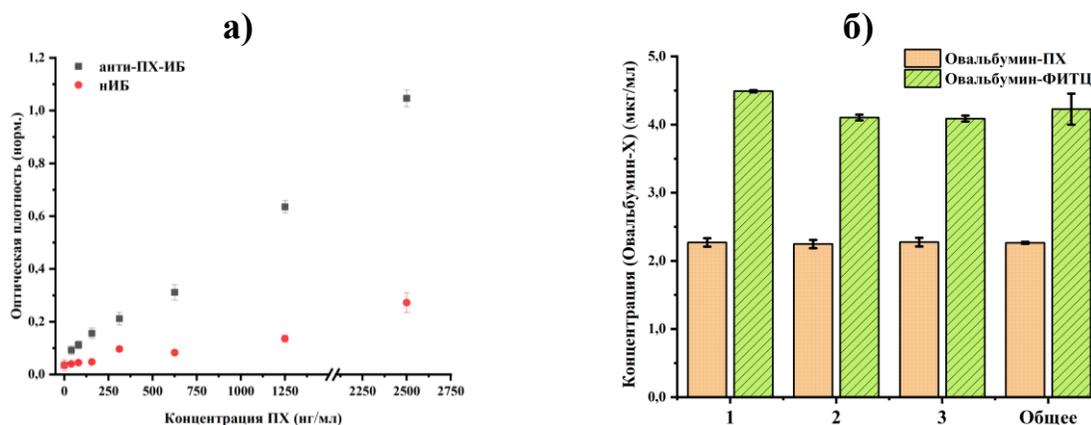


Рисунок 41. Сравнение эффективности связывания ПХ с ИБ и нИБ, на основе ГО (а), определение влияния природы метки на эффективность извлечения конъюгата овальбумина(б)

Установлена высокая специфичность извлечения ПХ на микропланшет с предварительно иммобилизованными ИБ (ИФ = 4,7). Результат демонстрирует возможность аналитического применения ИБ, специфичных к высокомолекулярным молекулам шаблонам. Показано, что концентрация конъюгата овальбумин-ФИТЦ иммобилизованного на поверхности ИБ в 2 раза

больше, чем концентрация овальбумин-ПХ. Это, вероятно, связано с размером метки и неустойчивостью контакта конъюгата с ферментом с сайтом связывания ИБ. В связи с этим при определении овальбумина из модельных растворов нами использован конъюгат овальбумин-ФИТЦ.

Изучено влияние буферных растворов, используемых при приготовлении растворов ИБ для иммобилизации, на эффективность определения овальбумина в формате конкурентного анализа. При использовании ацетатного (рН = 4,1), ФСБ (рН = 7,4) и карбонатного (рН = 9,6) буферных растворов более высокие аналитические характеристики определения овальбумина в модельных растворах получены при использовании карбонатного буферного раствора. Это, вероятно, связано с более благоприятными условиями взаимодействия молекул, обусловленными протолитическим равновесием ГО (изоэлектрическая точка = 4,2). Оптимальные результаты чувствительности определения овальбумина получены при разведении ИБ (1/10) и овальбумин-ФИТЦ (1/1000).

Изучено влияние блокирующих буферных растворов на основе ФСБ (рН = 7,4) с добавлением казеина (0,5; 0,75; 1, 2 % масс.) или БСА (0,5; 0,75; 1, 2 % об.). Большая концентрация белков в блокирующем буфере (> 1% масс.) увеличивает количество ложноотрицательных результатов за счет неспецифической сорбции конъюгата на блокированную поверхность. При этом флуоресцентный сигнал, полученный при определении овальбумина с использованием ФСБ, содержащего БСА был на 45% меньше, чем при применении блокирующего буфера с аналогичной концентрацией казеина. Таким образом, оптимальным является использование буферного раствора на основе ФСБ с добавлением казеина (0,75 % масс.).

Изучены аналитические характеристики определения овальбумина в модельных растворах с использованием полученных ИБ (рис. 42).

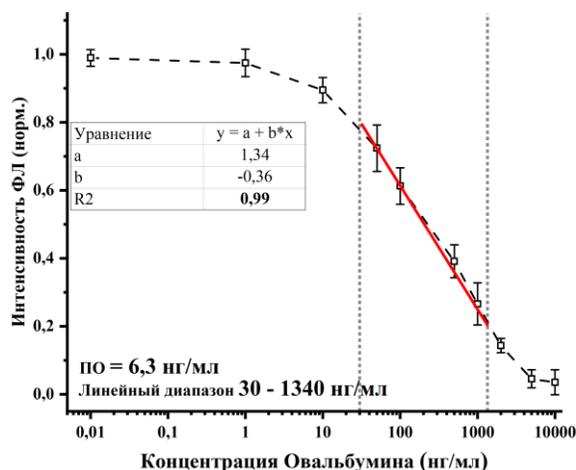


Рисунок 42. Градуировочная зависимость определения овальбумина в модельных растворах на основе импринтированной ГО иммобилизированной на поверхности микропланшета

Представленный конкурентный анализ на основе ИБ использован для определения овальбумина методом введено найдено в искусственно загрязнённых экстрактах кондитерского изделия (табл.6).

Таблица 6. Результаты определения содержания овальбумина в образцах экстракта кондитерского изделия (n=3)

<i><b>Введено (нг/мл)</b></i>	<i><b>Найдено (нг/мл)</b></i>	<i><b>Степень извлечения (%)</b></i>	<i><b>S<sub>r</sub></b></i>
100	95	95	6,3
200	245	120	4,5
500	480	96	5,1

### *Заключения по главе 5*

Таким образом, показана возможность получения ИБ, специфичных к ЗЕА. Изучена и установлена возможность применения 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля очистки сайтов связывания ИБ. Проведено успешное получение ИБ, специфичных к белковым молекулам шаблонам (овальбумин и ПХ), и использована двухстадийная комбинированная (диализ/эксклюзионная хроматография) методика их очистки. Разработан и успешно применен метод конкурентного определения ЗЕА с использованием импринтированных БСА, овальбумина и ГО, иммобилизированных на микропланшете, мультикапилляре и поверхности ПАНИ@ НЧ SiO<sub>2</sub> (табл. 7). Предложенная методика использована для определения ЗЕА в экстрактах пшеницы и кукурузы.

Таблица 7. Аналитические характеристики ИБ, специфичных к ЗЕА

<b>Белок</b>	<b>Носитель</b>	<b>Молекула шаблон</b>	<b>Линейный диапазон, нг/мл</b>	<b>ПО, нг/мл</b>	<b>ИФ</b>
БСА	Микропланшет	ЗЕА	8-260	4,1	2,2
Овальбумин	Мультикапилляр	ЗЕА	0,3-9,6	0,12	2,5
ГО	Микропланшет, ПАНИ@ НЧ SiO <sub>2</sub>	ЗЕА	8-190	5,1	2,5
ГО	Микропланшет, ПАНИ@ НЧ SiO <sub>2</sub>	4-ГК	24-200	12,2	2,0
ГО	Микропланшет, ПАНИ@ НЧ SiO <sub>2</sub>	Кумарин	54-240	25,4	1,7

Продемонстрирована возможность применения импринтированной ГО при определении овальбумина в линейный диапазоне 29–1342 нг/мл с ПО 6,3 нг/мл, что позволяет определять следовые количества овальбумина в пищевой

продукции. Показана возможность применения конкурентного метода на основе ИБ для определения овальбумина в экстрактах кондитерских изделий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны методы получения МИП на основе синтетических (полианилин, полиуретан, поливинилпирролидон) полимеров и белковых молекул (бычий сывороточный альбумин, овальбумин, глюкозооксидаза) и показана возможность их аналитического применения.
2. Разработана методика получения МИП на основе полианилина, специфичного к пероксидазе хрена, на поверхности стеклянных микрокапиллярных структур, использованная для определения ПХ в модельных растворах (ПО 0,07 нг/мл).
3. Продемонстрирована возможность применения молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга полиуретана и поливинилпирролидона, для определения ПХ в модельных растворах (ПУ: ПО 20 нг/мл; ПВП: ПО=8 нг/мл).
4. Предложен подход молекулярного импринтинга альбуминов (БСА, овальбумин) и глюкозооксидаза, специфичных к низко- (зеараленон, 4-гидроксикумарин, кумарин) и высокомолекулярным (овальбумин и ПХ) соединениям. Показана возможность замены ЗЕА при синтезе ИБ на его структурные аналоги. Предложен способ визуализации процесса очистки ИБ от молекул шаблонов методом диализа с применением 3D флуоресцентной спектроскопии.
5. Разработана методика определения ЗЕА на основе ИБ (ПО 5,4 нг/мл), проверенная в реальных объектах (пшеница, степень извлечения 96÷111%). Разработана методика определения овальбумина на основе импринтированной ГО (ПО 6,3 нг/мл) и проведена апробация методики на примере определения овальбумина в экстрактах кондитерских изделий (степень извлечения 95÷120%).

6. Продемонстрирована возможность создания бионеорганического сорбента на основе ИБ и коммерческих НЧ  $\text{SiO}_2$ , оценена возможность его использования для твердофазной экстракции ЗЕА на примере модельных растворов (степень извлечения  $\sim 60\%$ ).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Piletsky S. *Molecular Imprinting of Polymers* // CRC Press, 2006. 221 p.
2. Nair A., Chauhan P., Saha B., Kubatzky K. F. *Conceptual Evolution of Cell Signaling* // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 13. P. 3292.
3. Smith B.D. *Synthetic Receptors for Biomolecules: Design Principles and Applications* // RSC, 2015. 467 p.
4. Lehn J. M. *Supramolecular Chemistry: Receptors, Catalysts, and Carriers* // *Science*. 1985. Vol. 227, № 4689. P. 849–856.
5. Escobar L., Ballester P. *Molecular Recognition in Water Using Macrocyclic Synthetic Receptors* // *Chem. Rev.* 2021. Vol. 121, № 4. P. 2445–2514.
6. Martins J.N., Lima J.C., Basílio N. *Selective Recognition of Amino Acids and Peptides by Small Supramolecular Receptors* // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 1. P. 106.
7. Zhang Y. et al. *Molecularly Imprinted Nanomaterials with Stimuli Responsiveness for Applications in Biomedicine*// *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 3. P. 918.
8. Xu J. et al. *Molecularly Imprinted Synthetic Antibodies: From Chemical Design to Biomedical Applications* // *Small*. 2020. Vol. 16, № 27. P. 1906644.
9. Поляков М. В. *Адсорбционные свойства силикагеля и его структура* // *Журн. физ. химии*. 1931. Т. 2, № 6. С. 799–805.
10. BelBruno J.J. *Molecularly Imprinted Polymers: review-article* // *Chem. Rev.* 2019. Vol. 119, № 1. P. 94–119.
11. Mosbach K. *Molecular imprinting* // *Trends Biochem. Sci.* 1994. Vol. 19, № 1. P. 9–14.
12. Cormack P.A.G., Elorza A.Z. *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation* // *J. Chromatogr. B.* 2004. Vol. 804, № 1. P. 173–182.
13. Tarannum N. et al. *Molecularly imprinted polymers as receptors for assays of antibiotics* // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2020. Vol. 50, № 4. P. 291–310.
14. Cheong W.J., Yang S.H., Ali F. *Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews* // *J. Sep. Sci.* 2013. Vol. 36, № 3. P. 609–628.
15. Ahmad O.S. et al. *Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors* // *Trends Biotechnol.* 2019. Vol. 37, № 3. P. 294–309.

16. Mirata F., Resmini M. Molecularly Imprinted Polymers for Catalysis and Synthesis // *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology* / ed. Mattiasson B., Ye L. Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 107–129.
17. Li S. et al. Size matters: Challenges in imprinting macromolecules // *Prog. Polym. Sci.* 2014. Vol. 39, № 1. P. 145–163.
18. Whitcombe M.J. et al. The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection // *Chem. Soc. Rev.* 2011. Vol. 40, № 3. P. 1547–1571.
19. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 412, № 24. P. 6509–6517.
20. Hillberg A.L., Brain K.R., Allender C.J. Molecular imprinted polymer sensors: Implications for therapeutics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. Vol. 57, № 12. P. 1875–1889.
21. Baleviciute I. et al. Evaluation of theophylline imprinted polypyrrole film // *Synth. Met.* 2015. Vol. 209. P. 206–211.
22. Luliński P. Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. Vol. 76. P. 1344–1353.
23. Chen J. et al. Hollow-fiber membrane tube embedded with a molecularly imprinted monolithic bar for the microextraction of triazine pesticides // *Anal. Methods.* 2013. Vol. 6, № 2. P. 602–608.
24. Appell M., Mueller A. Mycotoxin Analysis Using Imprinted Materials Technology: Recent Developments // *J. AOAC Int.* 2016. Vol. 99, № 4. P. 861–864.
25. Cenci L. et al. Molecularly imprinted polymers coupled to matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry for femtomoles detection of cardiac troponin I peptides // *J. Mol. Recognit.* 2016. Vol. 29, № 1. P. 41–50.
26. Badhulika S., Mulchandani A. Molecular imprinted polymer functionalized carbon nanotube sensors for detection of saccharides // *Appl. Phys. Lett.* 2015. Vol. 107, № 9. P. 093107.
27. A. Lieberzeit P. et al. From metal ions to biospecies: template-assisted synthesis as a strategy to generate artificial receptor materials // *Adv. Mater. Lett.* 2011. Vol. 2, № 5. P. 319–321.

28. Gokulakrishnan K., Prakasam T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of ephedrine enantiomers // *Arab. J. Chem.* 2016. Vol. 9. P. S528–S536.
29. Tang W. et al. Preparation of hybrid molecularly imprinted polymer with double-templates for rapid simultaneous purification of theophylline and chlorogenic acid in green tea // *Talanta.* 2016. Vol. 152. P. 1–8.
30. Regasa M.B. et al. Molecularly imprinted polyaniline molecular receptor-based chemical sensor for the electrochemical determination of melamine // *J. Mol. Recognit.* 2020. Vol. 33, № 7. P. e2836.
31. Chu T.X. et al. Molecularly Imprinted Polyaniline Nanowire-Based Electrochemical Biosensor for Chloramphenicol Detection: A Kinetic Study of Aniline Electropolymerization // *J. Electrochem. Soc.* 2020. Vol. 167, № 2. P. 027527.
32. Serrano V.M. et al. In-situ production of Histamine-imprinted polymeric materials for electrochemical monitoring of fish // *Sens. Actuators B Chem.* 2020. Vol. 311. P. 127902.
33. Karimi M. et al. A graphene based-biomimetic molecularly imprinted polyaniline sensor for ultrasensitive detection of human cardiac troponin T (cTnT) // *Synth. Met.* 2019. Vol. 256. P. 116136.
34. Dehghani M., Nasirizadeh N., Yazdanshenas M.E. Determination of cefixime using a novel electrochemical sensor produced with gold nanowires/graphene oxide/electropolymerized molecular imprinted polymer // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. Vol. 96. P. 654–660.
35. Sun B. et al. Molecularly Imprinted Polymer-Nanoporous Carbon Composite-Based Electrochemical Sensor for Selective Detection of Calycosin // *J. Electrochem. Soc.* 2019. Vol. 166, № 6. P. H187–H193.
36. Kamel et al. Novel Solid-State Potentiometric Sensors Using Polyaniline (PANI) as A Solid-Contact Transducer for Flucarbazone Herbicide Assessment // *Polymers.* 2019. Vol. 11, № 11. P. 1796.
37. Essousi H., Barhoumi H. Electroanalytical application of molecular imprinted polyaniline matrix for dapsonе determination in real pharmaceutical samples // *J. Electroanal. Chem.* 2018. Vol. 818. P. 131–139.
38. Mandal S. et al. Selective Sensing of the Biotinyl Moiety Using Molecularly Imprinted Polyaniline Nanowires // *J. Electrochem. Soc.* 2018. Vol. 165, № 14. P. B669–B678.

39. Mostafavi M. et al. A new diclofenac molecularly imprinted electrochemical sensor based upon a polyaniline/reduced graphene oxide nano-composite // *Biosens. Bioelectron.* 2018. Vol. 122. P. 160–167.
40. Abu-Dalo M.A. et al. Azithromycin-molecularly imprinted polymer based on PVC membrane for Azithromycin determination in drugs using coated graphite electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2015. Vol. 751. P. 75–79.
41. Saksena K., Shrivastava A., Kant R. Chiral analysis of ascorbic acid in bovine serum using ultrathin molecular imprinted polyaniline/graphite electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2017. Vol. 795. P. 103–109.
42. Saxena S. et al. Molecularly Imprinted Polymer-based Novel Electrochemical Sensor for the Selective Detection of Aldicarb // *Phys. Status Solidi A.* 2020. Vol. 217, № 9. P. 1900599.
43. Vu V.-P. et al. Possible detection of antibiotic residue using molecularly imprinted polyaniline-based sensor: Possible detection of antibiotic residue using molecularly imprinted polyaniline-based sensor // *Vietnam J. Chem.* 2019. Vol. 57, № 3. P. 328–333.
44. Chen Z. et al. A Low-Cost Paper Glucose Sensor with Molecularly Imprinted Polyaniline Electrode // *Sensors.* 2020. Vol. 20, № 4. P. 1098.
45. Ayadi C. et al. Molecularly imprinted polyaniline on silica support for the selective adsorption of benzophenone-4 from aqueous media // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2019. Vol. 567. P. 32–42.
46. Orachorn N., Bunkoed O. A nanocomposite fluorescent probe of polyaniline, graphene oxide and quantum dots incorporated into highly selective polymer for lomefloxacin detection // *Talanta.* 2019. Vol. 203. P. 261–268.
47. Yu N., Mugo S.M. A flexible-imprinted capacitive sensor for rapid detection of adrenaline // *Talanta.* 2019. Vol. 204. P. 602–606.
48. Saadati F. et al. Synthesis and characterization of nanostructure molecularly imprinted polyaniline/graphene oxide composite as highly selective electrochemical sensor for detection of p -nitrophenol // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2018. Vol. 86. P. 213–221.
49. Kim W. et al. Molecularly Imprinted Chemiresistive Sensor for Specific Recognition of Furaneol as a Biomarker of Strawberry Flavor Conditions // *ACS Sens.* 2023. Vol. 8, № 4. P. 1542–1549.
50. Wang Q. et al. A facile horseradish peroxidase electrochemical biosensor with surface molecular imprinting based on polyaniline nanotubes // *J. Electroanal. Chem.* 2018. Vol. 817. P. 184–194.

51. Ponnaiah S.K., Periakaruppan P. A glassy carbon electrode modified with a copper tungstate and polyaniline nanocomposite for voltammetric determination of quercetin // *Microchim Acta*. 2018. Vol. 185, № 11. P. 524.
52. Rao H. et al. Electrochemical creatinine sensor based on a glassy carbon electrode modified with a molecularly imprinted polymer and a Ni@polyaniline nanocomposite // *Mikrochim. Acta*. 2017. Vol. 184, № 1. P. 261–269.
53. Luo J. et al. Synthesis of hydrophilic and conductive molecularly imprinted polyaniline particles for the sensitive and selective protein detection // *Biosens. Bioelectron*. 2017. Vol. 94. P. 39–46.
54. Luo J. et al. Preparation of water-compatible molecular imprinted conductive polyaniline nanoparticles using polymeric micelle as nanoreactor for enhanced paracetamol detection // *Chem. Eng. J*. 2016. Vol. 283. P. 1118–1126.
55. Bi X., Liu Z. Facile Preparation of Glycoprotein-Imprinted 96-Well Microplates for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay by Boronate Affinity-Based Oriented Surface Imprinting // *Anal. Chem*. 2014. Vol. 86, № 1. P. 959–966.
56. Wei J. et al. Detection of glycoprotein through fluorescent boronic acid-based molecularly imprinted polymer // *Anal. Chim. Acta*. 2017. Vol. 960. P. 110–116.
57. Li D. et al. Efficient vitamin B12-imprinted boronate affinity magnetic nanoparticles for the specific capture of vitamin B12 // *Anal. Biochem*. 2018. Vol. 561–562. P. 18–26.
58. Li Y., Jiang C. Trypsin electrochemical sensing using two-dimensional molecularly imprinted polymers on 96-well microplates // *Biosens. Bioelectron*. 2018. Vol. 119. P. 18–24.
59. Li D. et al. Efficient preparation of surface imprinted magnetic nanoparticles using poly (2-anilinoethanol) as imprinting coating for the selective recognition of glycoprotein // *Talanta*. 2018. Vol. 184. P. 316–324.
60. Wongkaew N. et al. Cytocompatibility of Mats Prepared from Different Electrospun Polymer Nanofibers // *ACS Appl. Bio Mater*. 2020. Vol. 3, № 8. P. 4912–4921.
61. Xue J. et al. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications // *Chem. Rev*. 2019. Vol. 119, № 8. P. 5298–5415.
62. Mirjalili M., Zohoori S. Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry // *J. Nanostruct. Chem*. 2016. Vol. 6, № 3. P. 207–213.

63. Yang F. et al. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, № 15. P. 2603–2610.
64. Awokoya K.N. et al. Molecularly imprinted electrospun nanofibers for adsorption of nickel-5,10,15,20-tetraphenylporphine (NTPP) in organic media // *J. Polym. Res.* 2013. Vol. 20, № 6. P. 148.
65. Zhai Y. et al. Electrochemical molecular imprinted sensors based on electrospun nanofiber and determination of ascorbic acid // *Anal. Sci.* 2015. Vol. 31, № 8. P. 793-798.
66. Zhu T. et al. Surface molecularly imprinted electrospun affinity membranes with multimodal pore structures for efficient separation of proteins // *J. Mater. Chem. B.* 2013. Vol. 1, № 46. P. 6449–6458.
67. Criscenti G. et al. Soft-molecular imprinted electrospun scaffolds to mimic specific biological tissues // *Biofabrication*. 2018. Vol. 10, № 4. P. 045005.
68. Patel K.D. et al. Molecularly Imprinted Polymers and Electrospinning: Manufacturing Convergence for Next-Level Applications // *Adv. Funct. Mater.* 2020. Vol. 30, № 32. P. 2001955.
69. Fletcher S., Hamilton A.D. Targeting protein–protein interactions by rational design: mimicry of protein surfaces // *J. R. Soc. Interface*. 2006. Vol. 3, № 7. P. 215–233.
70. Wang W. et al. Antibody Structure, Instability, and Formulation // *J. Pharm. Sci.* 2007. Vol. 96, № 1. P. 1–26.
71. Jeon Y. et al. Transcription Factor-Based Biosensors for Detecting Pathogens // *Biosensors*. 2022. Vol. 12, № 7. P. 470.
72. Fernandez-López R. et al. Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte // *Front. Microbiol.* 2015. Vol. 6. P. 648
73. Gemperli A.C. et al. Paralog-Selective Ligands for Bcl-2 Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 6. P. 1596–1597.
74. Holub J.M. Small Scaffolds, Big Potential: Developing Miniature Proteins as Therapeutic Agents // *Drug Dev. Res.* 2017. Vol. 78, № 6. P. 268–282.
75. Economou A. et al. Enzyme-based Sensors // *Advances in Food Diagnostics* / ed. Toldrá F., Nollet L.M.L : John Wiley & Sons, Ltd, 2017. P. 231–250.
76. Songa E.A., Okonkwo J.O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review // *Talanta*. 2016. Vol. 155. P. 289–304.

77. Пиденко П.С., Пресняков К.Ю., Бурмистрова Н.А. Белковые Молекулы: шаблоны и матрицы в молекулярном импринтинге // Журн. аналит. химии. 2023.Т. 78, № 8. С. 953–964.
78. Whitty A. Cooperativity and biological complexity // Nat. Chem. Biol. 2008. Vol. 4, № 8. P. 435–439.
79. Kriz D., Ansell R. J. Man Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry // Molecularly Imprinted Polymers. 2001. Vol. 23. P. 417–436.
80. Pauling L., Campbell D.H. The Production of Antibodies in Vitro // Science. 1942. Vol. 95, № 2469. P. 440–441.
81. Pauling L., Campbell D.H. The manufacture of Antibodies in vitro // Journal of Experimental Medicine. 1942. Vol. 76, № 2. P. 211–220.
82. Russell A.J., Klibanov A.M. Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263, № 24. P. 11624–11626.
83. González-Navarro H., Braco L. Improving lipase activity in solvent-free media by interfacial activation-based molecular bioimprinting // J. Mol. Catal. B Enzym. 1997. Vol. 3, № 1. P. 111–119.
84. Li Z. et al. Enhancing the performance of a phospholipase A1 for oil degumming by bio-imprinting and immobilization // J. Mol. Catal. B Enzym. 2016. Vol. 123. P. 122–131.
85. Sergeyeva T.A. Molecularly imprinted polymers as synthetic mimics of bioreceptors. 1. General principles of molecular imprinting // Biopolym. Cell. 2009. Vol. 25, № 4. P. 253–265.
86. Gutierrez R. A.V., Hedström M., Mattiasson B. Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor // Biotechnol. Rep. 2016. Vol. 11. P. 12–17.
87. Pidenko P. et al. Imprinted proteins for determination of ovalbumin // Anal. Bioanal. Chem. 2022. Vol. 414, № 18. P. 5609–5616.
88. Liu J. et al. Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 504, № 1. P. 185–189.
89. Ohya Y., Miyaoka J., Ouchi T. Recruitment of enzyme activity in albumin by molecular imprinting // Macromol. Rapid. Commun. 1996. Vol. 17, № 12. P. 871–874.
90. Peißker F., Fischer L. Crosslinking of imprinted proteases to maintain a tailor-made substrate selectivity in aqueous solutions // Bioorg. Med. Chem. 1999. Vol. 7, № 10. P. 2231–2237.

91. Yilmaz E. Bio-imprinting of microbial lipase at air–water interface // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 18, № 2. P. 141–145.
92. Gao J. et al. Lipase Immobilization through the Combination of Bioimprinting and Cross-Linked Protein-Coated Microcrystal Technology for Biodiesel Production // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2016. Vol. 55, № 42. P. 11037–11043.
93. Kwon O.H., Imanishi Y., Ito Y. Enhancement of Catalytic Activity of Chemically Modified Subtilisin Carlsberg in Benzene by Adjustment of Lyophilization Conditions // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2000. Vol. 73, № 5. P. 1277–1282.
94. Teague S.J. Implications of protein flexibility for drug discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. Vol. 2, № 7. P. 527–541.
95. Ma B. et al. Multiple diverse ligands binding at a single protein site: A matter of pre-existing populations // *Protein Sci.* 2002. Vol. 11, № 2. P. 184–197.
96. Conte L.L., Chothia C., Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites // Edited by A. R. Fersht // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 285, № 5. P. 2177–2198.
97. Boehr D.D., Nussinov R., Wright P.E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition // *Nat. Chem. Biol.* 2009. Vol. 5, № 11. P. 789–796.
98. Yan Y., Zhang X., Chen D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids // *Bioresour. Technol.* 2013. Vol. 131. P. 179–187.
99. Sánchez D.A. et al. Immobilization and bioimprinting strategies to enhance the performance in organic medium of the metagenomic lipase LipC12 // *J. Biotechnol.* 2021. Vol. 342. P. 13–27.
100. Matsumoto M., Hasegawa Y. Enzymatic Kinetics of Solvent-free Esterification with Bio-imprinted Lipase // *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2020. Vol. 33, № 4. P. 495–499.
101. Ozawa S., Klibanov A.M. Myoglobin-catalyzed epoxidation of styrene in organic solvents accelerated by bioimprinting // *Biotechnol. Lett.* 2000. Vol. 22, № 16. P. 1269–1272.
102. Klibanov A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents // *Nature.* 2001. Vol. 409, № 6817. P. 241–246.
103. Fishman A., Cogan U. Bio-imprinting of lipases with fatty acids // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2003. Vol. 22, № 3. P. 193–202.

104. Brandão L.M.S. et al. Lipase activation by molecular bioimprinting: The role of interactions between fatty acids and enzyme active site // *Biotechnol. Prog.* 2021. Vol. 37, № 1. P. e3064.
105. Pidenko P. et al. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // *Anal. Chim. Acta.* 2018. Vol. 1040. P. 99–104.
106. Sakamoto S. et al. Bioimprinting as a Receptor for Detection of Kwakhurin // *Biomolecules.* 2022. Vol. 12, № 8. P. 1064.
107. Griebenow K., Klibanov A.M. On Protein Denaturation in Aqueous–Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Vol. 118, № 47. P. 11695–11700.
108. Vaidya A., Fischer L. Stabilization of New Imprint Property of Glucose Oxidase in Pure Aqueous Medium by Cross-Linked-Imprinting Approach // *Immobilization of Enzymes and Cells* / ed. Guisan J.M: Humana Press, 2006. P. 175–183.
109. Sampath C., Belur P.D., Iyyasami R. Enhancement of n-3 polyunsaturated fatty acid glycerides in Sardine oil by a bioimprinted cross-linked *Candida rugosa* lipase // *Enzyme Microb. Technol.* 2018. Vol. 110. P. 20–29.
110. Yan J. et al. Preparation of a Crosslinked Bioimprinted Lipase for Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Processing Waste // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. Vol. 162, № 3. P. 757–765.
111. Cui J.D., Jia S.R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015. Vol. 35, № 1. P. 15–28.
112. Migneault I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking // *BioTechniques.* 2004. Vol. 37, № 5. P. 790–802.
113. Burmistrova N.A. et al. Soft glass multi-channel capillaries as a platform for bioimprinting // *Talanta.* 2020. Vol. 208. P. 120445.
114. Beloglazova N. et al. Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone // *Talanta.* 2019. Vol. 192. P. 169–174.
115. Murtaza G. et al. Glycated albumin based photonic crystal sensors for detection of lipopolysaccharides and discrimination of Gram-negative bacteria // *Anal. Chim. Acta.* 2020. Vol. 1117. P. 1–8.
116. Beloglazov V.I., Soukhoveev S.P., Suetin N.V. Three-dimensional micron and submicron structures based on fiberglass technologies // *Indo-Russian Workshop on Micromechanical Systems.* SPIE, 1999. Vol. 3903. P. 134–140.

117. Пиденко П.С. и др. Селективные сорбенты на основе импринтированной глюкооксидазы // Журн. аналит. химии. 2023. Т. 78, № 9. С. 1146–1151.
118. Zhu Z., Lu J.J., Liu S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review // *Anal. Chim. Acta*. 2012. Vol. 709. P. 21–31.
119. Trchová M., Stejskal J. Polyaniline: The infrared spectroscopy of conducting polymer nanotubes (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem*. 2011. Vol. 83, № 10. P. 1803–1817.
120. Drozd D.D. et al. Luminescent alloyed quantum dots for turn-off enzyme-based assay // *Anal. Bioanal. Chem*. 2022. Vol. 414, № 15. P. 4471–4480.
121. Drozd D.D. et al. Dihydrolipoic acid coated alloyed quantum dots // *Saratov Fall Meeting 2019: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine*. SPIE, 2020. Vol. 11457. P. 247–252.
122. Pidenko S.A. et al. Controlled chemical modification of the internal surface of photonic crystal fibers for application as biosensitive elements // *Opt. Mater*. 2016. Vol. 60. P. 283–289.
123. Dinish U. S. et al. Highly sensitive SERS detection of cancer proteins in low sample volume using hollow core photonic crystal fiber // *Biosens. Bioelectron*. 2012. Vol. 33, № 1. P. 293–298.
124. Rindorf L. et al. Photonic crystal fiber long-period gratings for biochemical sensing // *Opt. Express*. 2006. Vol. 14, № 18. P. 8224–8231.
125. Fan X. et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review // *Anal. Chim. Acta*. 2008. Vol. 620, № 1. P. 8–26.
126. Mahdizadeh F., Eskandarian M. Glucose oxidase and catalase co-immobilization on biosynthesized nanoporous SiO<sub>2</sub> for removal of dissolved oxygen in water: Corrosion controlling of boilers // *J. Ind. Eng. Chem*. 2014. Vol. 20, № 4. P. 2378–2383.
127. Zhou G. et al. Immobilization of glucose oxidase on rod-like and vesicle-like mesoporous silica for enhancing current responses of glucose biosensors // *Talanta*. 2011. Vol. 84, № 3. P. 659–665.
128. Tamer U. et al. Fabrication of Biosensor Based on Polyaniline/Gold Nanorod Composite // *Int. J. Electrochem. Sci*. 2011. Vol. 2011. P. e869742.
129. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques* // *Bioconjugate Techniques*. Elsevier Inc., 2008. 1202 p.

130. Könnings S. et al. A method for the incorporation of ovalbumin into immune stimulating complexes prepared by the hydration method // *Int. J. Pharm.* 2002. Vol. 241, № 2. P. 385–389.
131. Zhu X. et al. High Sensitive Detection of Cry1Ab Protein Using a Quantum Dot-Based Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay // *J. Agric. Food Chem.* 2011. Vol. 59, № 6. P. 2184–2189.
132. Hedman J. et al. Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics // *Accreditation Qual. Assur.* 2018. Vol. 23, № 3. P. 133–144.
133. Lv Y. et al. Silica-encapsulated quantum dots for highly efficient and stable fluorescence immunoassay of C-reactive protein // *Biochem. Eng. J.* 2018. Vol. 137. P. 344–351.
134. Cai W. et al. Bacteria assisted protein imprinting in sol–gel derived films // *Analyst.* 2018. Vol. 143, № 2. P. 555–563.
135. Бурмистрова Н.А. и др. Поликапиллярные системы в аналитической химии // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76, № 7. С. 785–796.
136. Stejskal J., Sapurina I. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 2005. Т. 77, № 5. С. 815–826.
137. Sapurina I.Y. et al. Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures // *New Polymers for Special Applications* / ed. Gomes A.D.S. IntechOpen, 2012. P. 251–312.
138. Trchová M., Šeděnková I., Stejskal J. In-situ polymerized polyaniline films 6. FTIR spectroscopic study of aniline polymerisation // *Synth. Met.* 2005. Vol. 154, № 1. P. 1–4.
139. Maier C. *Electrospun Fibers of Hydrogels to Design an Optical Sensor: Masterarbeit.* Universität Regensburg. Regensburg, 2015. 104 p.
140. Fan Y. et al. Various Types of Lipases Immobilized on Dendrimer-Functionalized Magnetic Nanocomposite and Application in Biodiesel Preparation // *Energy Fuels.* 2017. Vol. 31, № 4. P. 4372–4381.
141. Haque M.A. et al. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review // *Microb. Pathog.* 2020. Vol. 142. P. 104095.
142. Технический регламент Таможенного союза “О безопасности зерна” (ТР ТС 015/2011). 2011.

143. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). 2010.
144. Caubet J.-C., Wang J. Current Understanding of Egg Allergy // *Pediatric Clinics*. 2011. Vol. 58, № 2. P. 427–443.
145. Azarnia S. et al. Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC–ESI-MS/MS and ELISA // *Food Res. Int.* 2013. Vol. 52, № 2. P. 526–534.
146. Eissa S. et al. A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin // *Analyst*. 2013. Vol. 138, № 15. P. 4378–4384.
147. Haskard C.A., Li-Chan E.C.Y. Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes // *J. Agric. Food Chem.* 1998. Vol. 46, № 7. P. 2671–2677.
148. RCSB PDB: Homepage [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения: 29.11.2023).
149. Beloglazova N.V. et al. Immunochemical approach for zearalenone-4-glucoside determination // *Talanta*. 2013. Vol. 106. P. 422–430.
150. Beloglazova N.V. et al. Silica-coated liposomes loaded with quantum dots as labels for multiplex fluorescent immunoassay // *Talanta*. 2015. Vol. 134. P. 120–125.
151. Beloglazova N.V. et al. Sensitive QD@SiO<sub>2</sub>-based immunoassay for triplex determination of cereal-borne mycotoxins // *Talanta*. 2016. Vol. 160. P. 66–71.