

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С АНТИТЕЛАМИ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА

Е.П. Христунова, Е.В. Дорожко, Е.И. Короткова, Б. Крадохвил

Екатерина Петровна Христунова*, Богумил Крадохвил

Инженерная школа природных ресурсов, Отделение химической инженерии, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, просп. Ленина 30, Томск, Российская Федерация, 634050

Кафедра химии твердого тела, Химико-технологический университет в Праге, Техница 5, Прага 6, Чешская Республика, 16628

E-mail: eph2@tpu.ru*, Bohumil.Kratochvil@vscht.cz

Елена Владимировна Дорожко, Елена Ивановна Короткова

Инженерная школа природных ресурсов, Отделение химической инженерии, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, просп. Ленина 30, Томск, Российская Федерация, 634050

E-mail: elena-dorozhko@yandex.ru, eikor@tpu.ru

В последнее десятилетие возрос интерес к проведению электрохимических анализов для определения антител в клинических и биологических образцах, где вместо ферментной метки используют наночастицы металлов. Такие электрохимические сенсоры представляют собой новую тенденцию в разных областях аналитической химии. В работе проведены исследования электрохимического поведения наночастиц серебра, конъюгированных с антителами к вирусу клещевого энцефалита, на разных этапах модификации электрода. Наночастицы серебра синтезированы путем химического восстановления из нитрата серебра. Пассивная адсорбция была выбрана в качестве стратегии связывания серебряных наночастиц с антителами к вирусу клещевого энцефалита. Экспериментальным путем было найдено оптимальное содержание антител к вирусу клещевого энцефалита ($4,5 \text{ Ед мл}^{-1}$) в растворе наночастиц серебра [$1 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ AgNO}_3$]. В основе разработки электрохимического иммуносенсора применялся формат непрямого, неконкурентного иммуноферментного анализа. Методом циклической вольтамперометрии проведено исследование для определения эффективности модификации электрода с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. В качестве подложки для иммобилизации биологического материала использовался стеклоуглеродный электрод с нанесенным золотом. Установлено, что после проведения сенсбилизации электрода антигеном происходит пассивация его поверхности. Регистрация вольтамперометрического сигнала окисления серебра осуществлялась на немодифицированном стеклоуглеродном электроде при условиях: скорость развертки потенциала $0,1 \text{ В с}^{-1}$, потенциал накопления $-0,8 \text{ В}$, время накопления 60 с . Таким образом, настоящая работа открывает путь для нового альтернативного метода мониторинга антител к вирусу клещевого энцефалита в биологических жидкостях.

Ключевые слова: наночастицы серебра, биоконъюгат, электрохимический иммуносенсор, клещевой энцефалит

Для цитирования:

Христунова Е.П., Дорожко Е.В., Короткова Е.И., Крадохвил Б. Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра, конъюгированных с антителами к вирусу клещевого энцефалита, для разработки электрохимического иммуносенсора. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2020. Т. 63. Вып. 4. С. 28–33

For citation:

Khristunova E.P., Dorozhko E.V., Korotkova E.I., Kratochvil B. Investigation of electrochemical properties of silver nanoparticles conjugated with antibodies to tick-borne encephalitis for development of electrochemical immunosensor. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* [Russ. J. Chem. & Chem. Tech.]. 2020. V. 63. N 4. P. 28–33

INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES CONJUGATED WITH ANTIBODIES TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS FOR DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR

E.P. Khristunova, E.V. Dorozhko, E.I. Korotkova, B. Kratochvil

Ekaterina P. Khristunova*, Bohumil Kratochvil

Engineering School of Natural Resources, Department of Chemical Engineering, National Research Tomsk Polytechnic University, Lenin ave., 30, Tomsk, 634050, Russia

Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, Technicka, 5, 16628 Prague 6, Czech Republic

E-mail: eph2@tpu.ru*, Bohumil.Kratochvil@vscht.cz

Elena V. Dorozhko, Elena I. Korotkova

Engineering School of Natural Resources, Department of Chemical Engineering, National Research Tomsk Polytechnic University, Lenin ave., 30, Tomsk, 634050, Russia

E-mail: elena-dorozhko@yandex.ru, eikor@tpu.ru

In the past decade, interest to electrochemical assays have grown for determination antibodies in clinical and biological samples, where instead of the enzyme label metal nanoparticle is used. Such types of electrochemical immunosensors represent an upcoming trend in analytical chemistry. In this work, the electrochemical behavior of silver nanoparticles conjugated with antibodies to tick-borne encephalitis virus at different stages of electrode modification is investigated. Silver nanoparticles were obtained by chemical reduction from silver nitrate. Passive adsorption was chosen as a strategy for binding silver nanoparticles to antibodies to tick-borne encephalitis virus. The optimal ratio of antibodies to tick-borne encephalitis virus (4.5 IU ml^{-1}) in a solution of silver nanoparticles [$1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ AgNO}_3$] was found experimentally. The development of an electrochemical immunosensor was based on indirect, non-competitive format of enzyme-linked immunosorbent assay. The electrochemical situation on the electrode surface after modification steps was demonstrated by cyclic voltammetry using a standard redox pair $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Glassy carbon electrode with electrochemically deposited gold nanoparticles was used as a platform for immobilization of biological material. It has been established that after sensitization of the electrode with antigen, passivation of the surface occurs. The voltammetric signal was recorded through the detection of silver ions oxidation on unmodified glassy carbon electrode under the working conditions: scan rate 0.1 V s^{-1} , potential accumulation -0.8 V , accumulation time 60 s . Thus, this work paves the way for a new alternative method for monitoring antibodies to tick-borne encephalitis virus in biological fluids.

Key words: silver nanoparticles, bioconjugate, electrochemical immunosensor, Tick-borne encephalitis

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноанализы играют важную роль для обнаружения антител к различным вирусным возбудителям в клинических и биологических образцах [1-5]. Наиболее распространенный метод для обнаружения антител – иммуноферментный анализ (ИФА), где при обнаружении молекул-мишеней в качестве метки для регистрации сигнала используют ферменты [6]. Необходимая специфичность и чувствительность ИФА тест-систем достигается путем подбора условий иммобилизации антител/антигенов на твердой подложке, исследования неспецифического связывания с иммуносорбентом, проведения испытаний по пригодности ферментных конъюгатов. Возможность примене-

ния ферментов в качестве меток в ИФА обусловлена чрезвычайно высокой чувствительностью определения антител/антигенов при регистрации сигналов от хромогенов в присутствии определенного субстрата. Однако, основным недостатком применения ферментов в конъюгатах, является потеря их ферментативной активности (от 30 до 50%) во времени. Кроме того, маркерные ферменты хранятся только при низких температурах или в консервирующих растворах. Это приводит к необходимости периодической оценки их активности и рутинным валидационным процедурам ИФА тест-систем [7].

В связи с этим, в последние десятилетия наблюдается растущий интерес к разработке элек-

трохимических иммуносенсоров на основе наночастиц (НЧ) металлов, благодаря их высокой чувствительности, низкой стоимости и присущей им миниатюризации [8-15]. Использование металлических меток, как элементов распознавания биомолекул, является подходящей альтернативой ферментам.

Существенное количество работ в этой области посвящено применению серебряных НЧ для электрохимического обнаружения биомолекул [8-12]. В данной работе НЧ серебра были выбраны благодаря простому способу их получения и легко регистрируемому сигналу от ионов серебра. Значительную роль на пути развития высокочувствительных и селективных электрохимических иммуносенсоров играет подготовка биоконъюгатов с наночастицами серебра. В предыдущих работах нами успешно получен биоконъюгат наночастиц серебра с антителами к ВКЭ методом пассивной адсорбции, как альтернатива иммунопероксидазному конъюгату [16].

Основная идея данной работы заключалась в исследовании электрохимических свойств биоконъюгатов с наночастицами серебра на разных этапах разработки электрохимического иммуносенсора для выбора оптимальных условий определения антител к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ). Подготовка электрохимического иммуносенсора включает в себя: 1) иммобилизацию антигена ВКЭ на поверхности электрода; 2) инкубацию электрода в анализируемом растворе, предположительно содержащем антитела к ВКЭ; 3) инкубацию электрода в растворе биоконъюгата; 4) регистрацию вольтамперограмм окисления серебра биоконъюгатов на стеклоуглеродном электроде (СУЭ). Необходимо отметить, что этап иммобилизации антигена ВКЭ на поверхности электрода осуществлялся в несколько стадий: 1) электрохимическое нанесение золота на поверхность электрода; 2) формирование самоорганизующихся монослоев цистеина на поверхности золота; 3) использование ковалентного кросслинкера – глутарового альдегида [17]. Альтернативное использование глутарового альдегида в отношении пассивной сорбции антигена на поверхность электрода позволяет увеличить чувствительность определения антител к вирусу клещевого энцефалита в разрабатываемой тест системе [18].

В работе особое внимание уделено оценке достоверности вольтамперометрического сигнала окисления серебра, как метки биоконъюгатов, на всех этапах разработки электрохимического иммуносенсора для определения ВКЭ. На стадиях иммо-

билизации антигена ВКЭ на поверхности электрода исследовано влияние неспецифического связывания наночастиц серебра биоконъюгатов с модифицирующими слоями. Исследовано пассивирующее влияние модифицирующих слоев электрода при иммобилизации антигена ВКЭ на вольтамперометрический сигнал окисления серебра биоконъюгатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Наночастицы серебра были получены путем химического восстановления из нитрата серебра, методика описана в работе [19]. Биоконъюгаты серебряных наночастиц с антителами к ВКЭ получали пассивной адсорбцией [20]. Подбор оптимального количества антител к ВКЭ, добавляемых к НЧ серебра, осуществлялся с использованием алгоритма, представленного в литературных данных [21], в котором определяли стабильность полученных биоконъюгатов в растворе хлорида натрия 10% и регистрировали величины максимума поглощения при длине волны 405 нм. Спектроскопические исследования проводили на фотометре микропланшетного формата (Thermo Scientific Multiskan FC, США). В работе использованы антиген и антитела к ВКЭ из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG" (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия).

Иммобилизация антигена ВКЭ на поверхность электрода происходила в несколько стадий. На первом этапе модифицировали поверхность СУЭ золотом путем электрохимического осаждения из раствора тетрахлорауроной кислоты [22]. На втором этапе производили тиолирование поверхности Au-СУЭ в растворе цистеина (45 мин, 24-26 °С). После этого электрод помещали в раствор глутаральдегида (2,5%, 45 мин, 24-26 °С), затем антиген иммобилизовали на поверхности электрода. Время инкубации электрода в растворе антигена составляло 1 ч при 24-26 °С. Далее электрод погружали в 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 30 мин для блокировки мест неспецифического связывания. Эффективность модификации поверхности электрода оценивали методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Электрохимические сигналы от НЧ серебра проверялись после каждого этапа модификации, для этого электрод погружали в раствор биоконъюгата. Химическое растворение серебра с поверхности электрода осуществляли путем его погруже-

ния в 1 моль л⁻¹ раствор HNO₃ с последующей регистрацией сигнала методом анодной инверсионной вольтамперометрии на СУЭ. Электрохимические условия регистрации сигнала серебра: скорость развертки 0,1 В с⁻¹, потенциал накопления – 0,8 В, время накопления 60 с. Электрохимические исследования проводили на потенциостате μAutolab III (Metrohm, Нидерланды). Трехэлектродная ячейка была оснащена рабочим стеклоуглеродным электродом, в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода использовались хлоридсеребряный и платиновый электроды соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение биоконъюгатов, как сигналообразующей метки

На рис. 1 представлен спектр поглощения полученных наночастиц серебра, синтезированных путем химического восстановления из нитрата серебра.

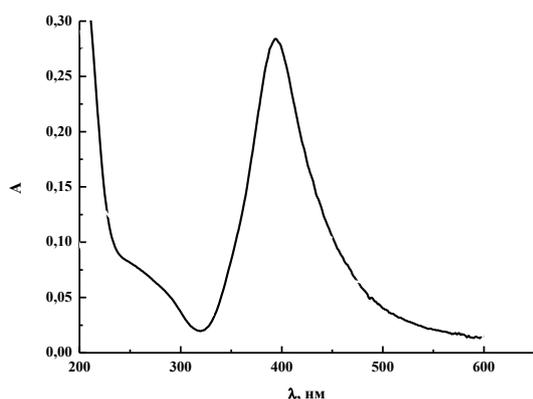


Рис. 1. Спектр поглощения наночастиц серебра [1 ммоль л⁻¹ AgNO₃], длина оптического пути 0,1 см, фон- деонизированная вода

Fig. 1. Absorption spectra of silver nanoparticles [1 mmol l⁻¹ AgNO₃], optical path length is 1.0 cm, blank – deionized water

Для получения биоконъюгатов различные концентрации антител к ВКЭ (1600-0,5 Ед мл⁻¹, 10 мкл) были добавлены к синтезированным НЧ серебра (100 мкл) со средним размером 5,3±1,2 нм. Благодаря своей белковой природе, антитела к ВКЭ могут выступать в качестве стабилизатора для предотвращения агрегации НЧ серебра и защиты их от коагулирующего действия электролитов [23]. Уменьшение оптической плотности при 405нм, изменение цвета полученных биоконъюгатов после добавления избытка раствора хлорида натрия (10%, 100мкл), может говорить о недостаточной концентрации антител для защиты НЧ серебра от коагулирующего действия хлорида натрия, что

приводит к их агрегации [21]. Спектрофотометрическим методом было подобрано оптимальное содержание антител к ВКЭ (4,5 Ед мл⁻¹) в растворе НЧ серебра [1 ммоль л⁻¹ AgNO₃] со средним размером коллоидной частицы 5,3±1,2 нм. Необходимо отметить, что соотношение концентраций антител к НЧ серебра, необходимое для стабилизации коллоида, зависит от ряда факторов (дисперсии НЧ по размерам, метода синтеза НЧ, природы восстановителя, типа антител), и такую оценку следует проводить с учетом конкретных задач исследования перед иммуноэлектрохимическими измерениями.

Электрохимические исследования

Эффективность модификации поверхности электрода оценивалась методом ЦВА с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻. На рис. 2. представлены ЦВА [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ на разных этапах модификации поверхности электрода.

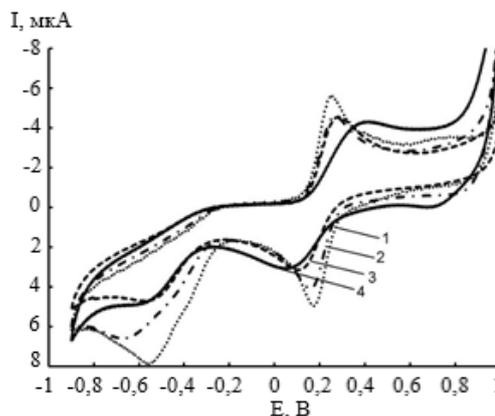


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (с=10 ммоль л⁻¹) в фоновом электролите 0,1 моль л⁻¹ KCl на разных этапах модификации поверхности электрода (1 – золото, 2 – цистеамин, 3 – глутаровый альдегид, 4 – антиген ВКЭ), скорость развертки потенциала 0,05 В с⁻¹

Fig. 2. Cyclic voltammograms of [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (с=10 mmol l⁻¹) at different electrode surfaces in 0.1 mol l⁻¹ KCl solution (1 – gold, 2 – cysteamine, 3 – glutaraldehyde, 4 – tick-borne encephalitis virus antigen), E vs. Ag|AgCl, scan rate is 0.05 V s⁻¹

Полученные результаты показывают, что поверхность электрода была успешно модифицирована. После каждого этапа модифицирования электрода увеличивается разность потенциалов между анодным и катодным пиками, что указывает на образование следующего слоя, из-за чего затруднен процесс переноса электрона.

Регистрацию электрохимического сигнала от НЧ серебра на разных этапах модификации электрода осуществляли методом анодной инверсионной вольтамперометрии на СУЭ. В таблице представлены значения токов окисления серебра

после каждого этапа модификации и последующего выдерживания электрода в растворе биоконъюгата.

Таблица
Электрохимический сигнала окисления серебра на разных этапах модификации электрода
Table. Electrochemical signal from silver oxidation at different modification steps

№	Этап модификации	I, мкА (n = 5)
1	Модифицирование поверхности электрода золотом	-
2	Тиолирование поверхности в растворе цистеамина	0,085±0,007
3	Сшивание с глутаровым альдегидом	-

Из таблицы видно, что после модификации поверхности электрода цистеамином на вольтамперограммах наблюдался ток окисления серебра. Это объясняется тем, что молекула цистеамина содержит группу $-NH_2$, которая может связывать НЧ серебра [24]. На следующей стадии модификации в растворе глутарового альдегида никаких сигналов от серебра не наблюдалось, что минимизирует возможность проникновения НЧ серебра в слой цистеамина и позволяет избежать неспецифического связывания.

Электрохимический иммуноанализ для определения антител к ВКЭ

Далее проводилась сборка электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ с целью оценки качества полученных биоконъюгатов. Подготовка электрохимического иммуносенсора описана в разделе введение. Анализируемый раствор представлял собой образец из коммерческого набора "ВектоВКЭ IgG" (Новосибирск, Россия) с содержанием антител к ВКЭ от 700 до 1000 Ед мл⁻¹. Контрольный эксперимент включал в себя все этапы получения электрохимического иммуносенсора, за исключением иммобилизации антигена; вся поверхность была заблокирована БСА.

Основываясь на результатах измерений ЦВА установлено, что происходит пассивация поверхности электрода после проведения этапов модификации, поэтому регистрация сигнала окисления серебра осуществлялась на немодифицированном СУЭ. Химическое растворение серебра с поверхности электрода производили путем его погружения в 1 моль·л⁻¹ раствор HNO₃.

На рис. 3 показаны вольтамперограммы окисления серебра в биоконъюгатах на СУЭ в присутствии и отсутствии антигена ВКЭ на поверхности электрода.

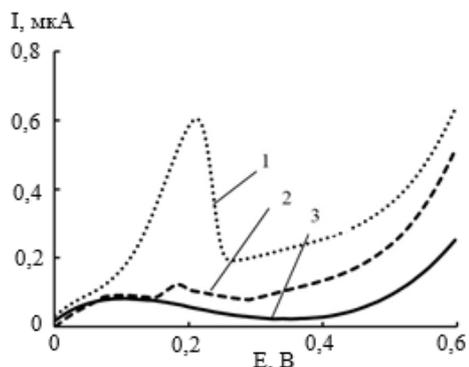


Рис. 3. Вольтамперограммы окисления серебра в биоконъюгатах на СУЭ (1 – с антигеном на поверхности электрохимического иммуносенсора, 2 – контрольный эксперимент без антигена, 3 – фоновая линия) в фоновом электролите 0,5 моль л⁻¹ KNO₃ и 0,04 моль л⁻¹ HNO₃, скорость развертки потенциала 0,1 В с⁻¹, E_{нак} = -0,8 В, t_{нак} = 60 с

Fig. 3. Voltammograms of silver oxidation in bioconjugate at the glassy carbon electrode; (1 – antigen immobilized on the electrochemical immunosensor, 2 – without the antigen immobilized on the immunosensor surface, 3 – background) in supporting electrolyte of 0.5 mol l⁻¹ KNO₃ and 0.04 mol l⁻¹ HNO₃, E vs. Ag|AgCl. Scan rate is 100 mV s⁻¹, E_{acc} = -0.8 V, t_{acc} = 60 s

Как видно из рис. 3, в случае контрольного эксперимента наблюдается электрохимический сигнал от серебра, который не превышает 5% от максимума значения тока окисления серебра в образцах с присутствием антигена на поверхности электрода. В связи с этим, можно с уверенностью сказать, что полученные биоконъюгаты, способы модификации электрода антигеном ВКЭ и регистрации сигнала окисления НЧ серебра в условиях анодной инверсионной вольтамперометрии на немодифицированном СУЭ, могут быть успешно применены для определения антител к ВКЭ.

ВЫВОДЫ

В работе было подобрано оптимальное соотношение концентраций антител к ВКЭ (4,5 Ед мл⁻¹) для связывания и стабилизации НЧ серебра [1 ммоль л⁻¹ AgNO₃] с средним размером коллоидной частицы 5,3±1,2 нм. Необходимо отметить, что соотношение концентраций зависит от ряда факторов (дисперсии, метода синтеза НЧ, природы восстановителя, типа антител), и такую оценку следует проводить с учетом конкретных задач исследования. Полученные биоконъюгаты успешно применены в разработке электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ.

Для построения дальнейших экспериментов вынесены следующие рекомендации: проводить регистрацию сигнала окисления серебра на немодифицированном электроде; при построении калибровочных зависимостей для определения антител к ВКЭ необходимо вычитать абсолютное

значение тока окисления серебра, полученного в отрицательных контрольных экспериментах, от значения тока окисления серебра полученного в положительных образцах с присутствием антигена на поверхности электрода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ЧНФ в рамках научного проекта № 19-53-26001. Исследование выполнено при поддержке Государственной программы Российской Федерации «Наука» № 1.0031.ГЗБ.2020.

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

1. **Ali Z., Wang J., Tang J., Liu B., He N., Li Z.** Simultaneous detection of multiple viruses based on chemiluminescence and magnetic separation. *Biomater. Sci.* 2017. V. 5. P. 57–66. DOI: 10.1039/c6bm00527f.
2. **Hwang J., Lee S., Choo J.** Application of a SERS-based lateral flow immunoassay strip for rapid and sensitive detection of Staphylococcal Enterotoxin B. *Nanoscale.* 2016. V. 8. N 22. P. 11418–11425. DOI: 10.1039/c5nr07243c.
3. **Farka Z., Juřík T., Kovář D., Trnková L., Skládal P.** Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: recent advances and challenges. *Chem. Rev.* 2017. V. 117. 9973–10042. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00037.
4. **Kuhle J., Barro C., Andreasson U., Derfuss T., Lindberg R., Sandelius A., Liman V., Norgren N., Blennowa K., Zetterberga H.** Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med.* 2016. V. 54. N 10. P. 1655–61. DOI 10.1515/cclm-2015-1195.
5. **Shu J., Tang D.** Current advances in quantum-dots-based photoelectrochemical immunoassays. *Chem. Asian J.* 2017. V. 12. P. 2780–2789. DOI: 10.1002/asia.201701229.
6. **Ackermann-Gäumann R., Tritten M.L., Hassan M., Lienhard R.** Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018. V. 9. P. 956–962. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.031.
7. **Espina V., Woodhouse E.C., Wulfkühle J., Asmussen H.D., Petricoin E.F., Liotta L.A.** Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J. Immunol. Meth.* 2004. V. 290. P. 121–133. DOI: 10.1016/j.jim.2004.04.013.
8. **Hao N., Li H., Long Y., Zhang L., Zhao X., Xu D., Chen H.Y.** An electrochemical immunosensing method based on silver nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.* 2011. V. 656. P. 50–54. DOI: 10.1016/j.jelechem.2011.01.029.
9. **Tauran Y., Brioude A., Coleman A.W., Rhimi M., Kim B.** Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World J. Biol. Chem.* 2013. V. 4. P. 35–63. DOI: 10.4331/wjbc.v4.i3.35.
10. **Abbaspour A., Norouz-Sarvestani F., Noori A., Soltani N.** Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus. *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 68. P. 149–155. DOI: 10.1016/j.bios.2014.12.040.
11. **Roushani M., Shahdost-Fard F.** A novel ultrasensitive aptasensor based on silver nanoparticles measured via enhanced voltammetric response of electrochemical reduction of riboflavin as redox probe for cocaine detection. *Sensors Actuators, B Chem.* 2015. V. 207. P. 764–771. DOI: 10.1016/j.snb.2014.10.131.
12. **Szymanski M.S., Porter R.A.** Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 2013. V. 387. P. 262–269. DOI: 10.1016/j.jim.2012.11.003.
13. **Rivas L., Mayorga-Martínez C.C., Quesada-González D., Zamora-Gálvez A., De La Escosura-Muñiz A., Merkoçi A.** Label-free impedimetric aptasensor for ochratoxin-A detection using iridium oxide nanoparticles. *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 5167–5172. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00890.
14. **Zhang J., Ma J., Zhang S., Wang W., Chen Z.** A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on CuO nanoparticles decorated carbon spheres. *Sensors Actuators, B Chem.* 2015. V. 211. P. 385–391. DOI: 10.1016/j.snb.2015.01.100.
15. **Liu G., Lin Y.** Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta.* 2007. V. 74. P. 308–317. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.10.014.
16. **Khristunova Y., Korotkova E., Kratochvil B., Barek J., Dorozhko E., Vyskocil V., Plotnikov E., Voronova O., Sidelnikov V.** Preparation and investigation of silver nanoparticle – antibody bioconjugates for electrochemical immunoassay of Tick-Borne Encephalitis. *Sensors.* 2019. V. 19. P. 2103–2113. DOI: 10.3390/s19092103.
17. **Pivetal J., Pereira F.M., Barbosa A.I., Castanheira A.P., Reis N.M., Edwards A.D.** Covalent immobilisation of antibodies in Teflon-FEP microfluidic devices for the sensitive quantification of clinically relevant protein biomarkers. *Analyt.* 2017. V. 142. P. 959–968. DOI: 10.1039/c6an02622b.
18. **Trilling A.K., Beekwilder J., Zuilhof H.** Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyt.* 2013. V. 138. P. 1619 – 1627. DOI: 10.1039/c2an36787d.
19. **Mulfinger L., Solomon S.D., Bahadory M., Jeyarajasingam A.V., Rutkowsky S.A., Boritz C.** Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ.* 2007. V. 84. P. 322–325. DOI: 10.1021/ed084p322.
20. **Szymanski M.S., Porter R.A.** Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 2013. V. 387. P. 262–269. DOI: 10.1016/j.jim.2012.11.003.
21. **Greg T. Hermanson.** Bioconjugate techniques. Oxford: Academic Press, Elsevier. 2008. P. 927.
22. **Transatti S., Petrii O.A.** Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* 1991. V. 63. P. 711–734. DOI: 10.1351/pac199163050711.
23. **You C.C., Chomposor A., Rotello V.M.** The biomacromolecule-nanoparticle interface. *Nano Today.* 2007. V. 2. P. 34–43. DOI: 10.1016/S1748-0132(07)70085-3.
24. **Agnihotri S., Mukherji S., Mukherji S.** Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale.* 2013. V. 5. P. 7328–73240. DOI: 10.1039/c3nr00024a.

Поступила в редакцию 12.11.2019
Принята к опубликованию 20.02.2020

Received 12.11.2019
Accepted 20.02.2020