



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 161 653** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) МПК<sup>7</sup> **C 12 Q 1/00, G 01 N 33/48**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

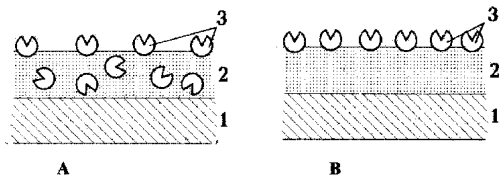
(21), (22) Заявка: 98116346/13, 24.08.1998  
(24) Дата начала действия патента: 24.08.1998  
(46) Дата публикации: 10.01.2001  
(56) Ссылки: RU 2107296 C1, 20.03.1998. WO 96/02001 A1, 25.01.1996. RU 2032908 C1, 10.04.1995.  
(98) Адрес для переписки:  
121108, Москва, ул. Кастанаевская, д.48,  
кв.46, Фармаковскому Д.А.

(71) Заявитель:  
Фармаковский Дмитрий Александрович,  
Милановский Евгений Юрьевич,  
Черкасов Владимир Рюрикович,  
Бирюков Юрий Сергеевич,  
Леонардова Ольга Викторовна  
(72) Изобретатель: Фармаковский Д.А.,  
Милановский Е.Ю., Черкасов В.Р., Бирюков  
Ю.С., Леонардова О.В.  
(73) Патентообладатель:  
Фармаковский Дмитрий Александрович,  
Милановский Евгений Юрьевич,  
Черкасов Владимир Рюрикович,  
Бирюков Юрий Сергеевич,  
Леонардова Ольга Викторовна

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БИОМОЛЕКУЛ

(57)  
Изобретение касается лабораторных исследований и анализов различных биологических и природных жидкостей, проводимых с целью медицинской диагностики, производственного и экологического мониторинга. Способ предусматривает формирование биосенсора путем нанесения на поверхность потенциометрического электрода в ходе электрохимического синтеза из раствора мономера пленки электропроводящего полимера, осуществление контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости, составление электрохимической измерительной ячейки из погруженных в буферный раствор и связанных измерительным устройством биосенсора и электрода сравнения, регистрацию посредством измерительного устройства потенциала биосенсора относительно электрода сравнения в рабочем буферном растворе, регистрацию посредством измерительного устройства изменения потенциала биосенсора при скачкообразном изменении ионной силы рабочего буферного раствора при постоянном значении величины его рН и расчет по величине изменения потенциала биосенсора количественного содержания анализируемого компонента в исследуемой жидкости. При этом электропроводящий полимер на стадии электрохимического синтеза допируют

анионами, обладающими наибольшей способностью к ионному обмену с окружающим полимер раствором, иммобилизуют в или на пленку электропроводящего полимера авидин или стрептавидин. Для иммобилизации на пленку электропроводящего полимера используют биотинилированные аффинные биорецепторы, с которыми осуществляют контакт биосенсора перед составлением электрохимической ячейки. Перед измерением потенциала биосенсора в рабочем растворе, осуществляют контакт биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами, а регистрацию изменения потенциала биосенсора осуществляют при изменении состава рабочего раствора. Способ дает возможность осуществить анализ малых и незаряженных биомолекул и получить строгие количественные результаты. Кроме того, он позволяет увеличить срок хранения получаемых при его реализации биосенсоров, повысить производительность и чувствительность анализа, достоверность и воспроизводимость получаемых результатов. 42 з.п. ф-лы, 12 ил.



Фиг.1

RU 2161653 C2

RU 2161653 C2



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 161 653** <sup>(13)</sup> **C2**  
 (51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 Q 1/00, G 01 N 33/48**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98116346/13, 24.08.1998  
 (24) Effective date for property rights: 24.08.1998  
 (46) Date of publication: 10.01.2001  
 (98) Mail address:  
 121108, Moskva, ul. Kastanaevskaja, d.48,  
 kv.46, Farmakovskomu D.A.

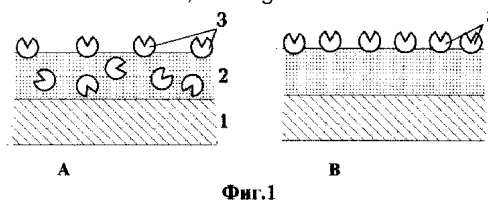
(71) Applicant:  
 Farmakovskij Dmitrij Aleksandrovich,  
 Milanovskij Evgenij Jur'evich,  
 Cherkasov Vladimir Rjurikovich,  
 Birjukov Jurij Sergeevich,  
 Leonardova Ol'ga Viktorovna  
 (72) Inventor: Farmakovskij D.A.,  
 Milanovskij E.Ju., Cherkasov V.R., Birjukov  
 Ju.S. , Leonardova O.V.  
 (73) Proprietor:  
 Farmakovskij Dmitrij Aleksandrovich,  
 Milanovskij Evgenij Jur'evich,  
 Cherkasov Vladimir Rjurikovich,  
 Birjukov Jurij Sergeevich,  
 Leonardova Ol'ga Viktorovna

(54) **METHOD OF QUANTITATIVE ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF BIOLOGICAL MOLECULES**

(57) Abstract:

FIELD: laboratory examination and analysis of various biological and natural liquids conducted in interests of medical diagnostics, commercial and ecological monitoring. SUBSTANCE: method includes formation of biological sensor by way of deposition of film of current-conducting polymer on surface of potentiometric electrode in process of electrochemical synthesis from monomer solution, realization of contact of biological sensor with sample of examined liquid, formation of electrochemical measurement cell from biological sensor and comparison electrode submerged in buffer solution and coupled by measurement device, recording of potential of biological sensor with regard to comparison electrode in working buffer solution with the aid of measurement device, recording of change of potential of biological sensor with sudden change of ion force of working buffer solution with constant value of its pH by means of measurement device and computation of quantitative content of analyzed component in examined liquid by value of change of potential of biological sensor. In this case current-conducting polymer is doped with anions showing highest capability for ion exchange with solution surrounding polymer at stage of electrochemical synthesis and

avidin or streptoavidin is immobilized in or on film of current-conducting polymer. Biotic affine bioreceptors are used for immobilization of current-conducting polymer on film, they are used for realization of contact of biological sensor before formation of electrochemical cell. Contact of biological sensor with additional labeled bioreceptors is carried out prior to measurement of potential of biological sensor in working solution and change of potential of biological sensor is recorded with change of content of working solution. Method makes it possible to analyze small and uncharged biological molecules and to obtain strict quantitative results. It also allows storage time of realization of biological sensors to be prolonged, productivity and sensitivity of analysis as well as authenticity and reproducibility of obtained results to be raised. EFFECT: raised productivity, sensitivity and authenticity of analysis and reproducibility of its results. 42 cl, 23 dwg



RU 2 161 653 C2

RU 2 161 653 C2

Изобретение относится к области медицины, биотехнологии, сельского хозяйства, экологии и охраны окружающей среды, а именно, к способам лабораторных исследований и анализов различных биологических и природных жидкостей, проводимых с целью медицинской диагностики, производственного и экологического мониторинга.

Электрохимический анализ биомолекул, таких, как различные антигены, антитела, молекулы ДНК и др., в биологических жидкостях при помощи биосенсоров является одним из наиболее перспективных и привлекательных методов инструментального анализа. Неослабевающий интерес и большое количество публикаций обусловлены следующими основными преимуществами метода: высокой чувствительностью, простотой, возможностью использования относительно простого и дешевого оборудования.

Известен способ электрохимического анализа биомолекул при помощи биосенсора [1], заключающийся в следующем:

изготавливают биосенсор, представляющий собой электрохимический датчик, включающий в себя керамическую подложку и расположенные на ее поверхности золотые планарные электроды гребенчатой формы;

на поверхности одного из электродов формируют путем электрохимического синтеза из раствора, включающего в себя мономер, фоновый электролит и растворитель, пленку электропроводящего полимера;

в ходе электрохимического синтеза допируют полимер бифункциональным сшивающим агентом путем добавления сшивающего агента в раствор для электрохимической полимеризации;

иммобилизуют соответствующие биорецепторы (ферменты, антигены, ДНК-зонды) на пленку электропроводящего полимера после электрохимического синтеза путем химического сшивания молекул биорецепторов с пленкой полимера, для чего погружают электрод, покрытый пленкой электропроводящего полимера, допированного сшивающим агентом, в раствор, содержащий биорецепторы, с последующей инкубацией в нем в течение определенного отрезка времени, либо путем адсорбции молекул биорецепторов на поверхность электропроводящего полимера, для чего погружают электрод, покрытый пленкой электропроводящего полимера, в раствор, содержащий биорецепторы, с последующей инкубацией в нем в течение определенного отрезка времени;

проводят блокировку свободной поверхности электропроводящего полимера инертным белком, для чего приводят электрод, покрытый пленкой электропроводящего полимера, в контакт с раствором инертного белка;

погружают полученный описанным выше способом биосенсор и электрод сравнения в чистый буферный раствор и подключают электроды биосенсора и электрод сравнения к измерительному устройству;

регистрируют относительно электрода сравнения изменение потенциала электрода, покрытого пленкой электропроводящего полимера с иммобилизованными

биорецепторами, при импульсном включении тока между двумя электродами биосенсора регистрируют "кривую заряжения"  $U_1(t)$  электрода с иммобилизованными биорецепторами;

переносят биосенсор в исследуемый раствор и инкубируют в нем в течение фиксированного отрезка времени;

переносят биосенсор и электрод сравнения в чистый буферный раствор и вновь регистрируют "кривую заряжения"  $U_2(t)$  электрода с иммобилизованными биорецепторами;

вычисляют в условных единицах величины площадей, ограниченных кривыми  $U_1(t)$  и  $U_2(t)$  (в координатах "потенциал электрода - время регистрации");

на основании отличия величин площадей, ограниченных кривыми  $U_1(t)$  и  $U_2(t)$ , делают вывод о наличии или отсутствии в исследуемой жидкости биомолекул, специфичных к биорецепторам, иммобилизованным на биосенсоре.

Известен способ электрохимического анализа биомолекул при помощи биосенсора [2], заключающийся в следующем:

изготавливают биосенсор, представляющий собой электрохимический датчик, включающий в себя керамическую подложку и расположенные на ее поверхности два независимых золотых планарных электрода гребенчатой формы;

на поверхности одного из электродов формируют путем электрохимического синтеза из раствора, включающего в себя мономер, фоновый электролит и растворитель, первый слой электропроводящего полимера;

на поверхности первого слоя электропроводящего полимера формируют второй слой электропроводящего полимера с одновременной иммобилизацией в него биорецепторов (антител) путем добавления биорецепторов в раствор для электрохимического синтеза;

погружают полученный описанным выше способом биосенсор и электрод сравнения в буферный раствор и подключают электроды биосенсора и электрод сравнения к измерительному устройству;

пропускают постоянный ток заданной величины между планарными электродами биосенсора и измеряют величину потенциала электрода сравнения относительно электрода, покрытого электропроводящим полимером с иммобилизованными биорецепторами;

переносят биосенсор и электрод сравнения в образец исследуемой жидкости, разведенный буферным раствором, и измеряют при том же значении величины постоянного тока величину потенциала электрода сравнения относительно электрода, покрытого электропроводящим полимером с иммобилизованными биорецепторами;

переносят биосенсор и электрод сравнения в чистый буферный раствор и измеряют величину потенциала электрода сравнения относительно электрода, покрытого электропроводящим полимером;

на основании величины изменения потенциала электрода сравнения в буферном растворе, содержащем образец исследуемой жидкости, делают вывод о наличии или отсутствии в исследуемой жидкости биомолекул, специфичных к биорецепторам,

иммобилизованным на биосенсоре.

Известен способ электрохимического анализа биомолекул при помощи биосенсора [3], заключающийся в следующем:

изготавливают биосенсор, формируя на поверхности металлического потенциометрического электрода пленку электропроводящего полимера при помощи электрохимического синтеза из раствора, включающего в себя мономер, фоновый (background) электролит и растворитель;

одновременно с электрохимическим синтезом осуществляют иммобилизацию в пленку электропроводящего полимера соответствующих биорецепторов, добавляя соответствующие биорецепторы в раствор для электрохимического синтеза;

составляют электрохимическую ячейку, погружая связанные измерительным прибором биосенсор и электрод сравнения в емкость, заполненную буферным раствором с фиксированным значением pH;

регистрируют в течение фиксированного отрезка времени величину потенциала биосенсора относительно электрода сравнения;

скачкообразно изменяют ионную силу раствора в электрохимической ячейке путем контакта биосенсора с исследуемой жидкостью, вводя в емкость с буферным раствором образец исследуемой жидкости, поддерживая при этом постоянное значение pH буферного раствора;

регистрируют в течение фиксированного отрезка времени изменение потенциала биосенсора относительно электрода сравнения;

переносят биосенсор и электрод сравнения в чистый буферный раствор с тем же значением величины pH и регистрируют в течение фиксированного отрезка времени изменение потенциала биосенсора относительно электрода сравнения;

вычисляют в условных единицах величины площадей, ограниченных кривыми изменения потенциала биосенсора (в координатах "потенциал биосенсора - время измерения"), в буферном растворе, содержащем образец исследуемой жидкости ( $S_1$ ), и в чистом буферном растворе ( $S_2$ );

на основании отношения  $S_1/S_2$  делают вывод о наличии или отсутствии в исследуемой жидкости биомолекул, специфичных к биорецепторам, иммобилизованным на биосенсоре.

К недостаткам описанных выше способов следует отнести:

сложность и невысокую технологичность процесса изготовления биосенсора;

нестабильность характеристик получаемых биосенсоров;

невозможность хранения получаемых биосенсоров без потери их работоспособности;

невоспроизводимость получаемых в ходе анализа результатов;

низкую производительность анализа;

невозможность осуществления анализа малых и незаряженных биомолекул;

невозможность получения в ходе анализа достоверных количественных результатов.

Технический результат, достигаемый заявленным изобретением, заключается в разработке способа количественного электрохимического анализа биомолекул, в

значительной степени лишенного недостатков, характерных для способов, описанных выше, а именно, в расширении области его применения за счет возможности осуществления анализа малых и незаряженных биомолекул и возможности получения строгих количественных результатов, повышении его технологичности, увеличении срока хранения получаемых биосенсоров, увеличении производительности и чувствительности анализа, повышении достоверности и воспроизводимости получаемых результатов.

Сущность изобретения заключается в достижении упомянутого технического результата в способе количественного электрохимического анализа биомолекул, предусматривающем формирование биосенсора путем нанесения на поверхность потенциометрического электрода в ходе электрохимического синтеза из раствора мономера пленки электропроводящего полимера,

осуществление контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости,

составление электрохимической измерительной ячейки из погруженных в буферный раствор и связанных измерительным устройством биосенсора и электрода сравнения,

регистрацию посредством измерительного устройства потенциала биосенсора относительно электрода сравнения в буферном растворе,

регистрацию посредством измерительного устройства изменения потенциала биосенсора при скачкообразном изменении ионной силы буферного раствора при постоянном значении величины его pH,

в котором (дополнительно) допируют электропроводящий полимер на стадии электрохимического синтеза анионами, обладающими наибольшей способностью к ионному обмену с окружающим полимер раствором,

иммобилизуют в/на пленку электропроводящего полимера авидин или стрептавидин,

для иммобилизации на пленку электропроводящего полимера используют биотинилированные аффинные биорецепторы,

используют дополнительные меченые биорецепторы,

перед составлением электрохимической ячейки осуществляют контакт биосенсора с биотинилированными аффинными биорецепторами,

перед измерением потенциала биосенсора в буферном растворе осуществляют контакт биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами,

регистрацию изменения потенциала биосенсора осуществляют при изменении состава буферного раствора,

Более подробно изобретение заключается в следующем.

1. Наносят на поверхность потенциометрического электрода при помощи электрохимического синтеза из раствора мономера пленку электропроводящего полимера.

Электропроводящий полимер выполняет при этом двоякую функцию, обеспечивая, с

одной стороны, фиксацию биологического материала на поверхности биосенсора и, с другой стороны, чувствительность биосенсора к изменению состава буферного раствора.

2. Для увеличения чувствительности анализа и уменьшения времени его проведения допируют электропроводящий полимер на стадии его электрохимического синтеза анионами, обладающими наибольшей способностью к ионному обмену с анионами окружающего полимер раствора, для чего добавляют в раствор для электрохимической полимеризации соль, анионы которой обладают большим ионным радиусом.

3. Для максимального увеличения срока хранения работоспособного биосенсора, повышения технологичности процесса получения биосенсора, а также с целью увеличения достоверности получаемых в ходе анализа результатов осуществляют иммобилизацию авидина или стрептавида в пленку электропроводящего полимера на стадии его электрохимического синтеза путем включения молекул авидина или стрептавида в структуру электропроводящего полимера или на пленку электропроводящего полимера после его электрохимической полимеризации путем адсорбции на поверхность полимера.

4. Для расширения области применения анализа, повышения технологичности процесса получения биосенсора, а также с целью увеличения достоверности получаемых в ходе анализа результатов для иммобилизации на пленку электропроводящего полимера используют биотинилированные аффинные биорецепторы - специфичные к анализируемым биомолекулам биорецепторы, молекулы которых конъюгированы с биотином.

В качестве биорецепторов используют моноклональные и поликлональные антитела, антигены, однопитевые молекулы ДНК, ДНК-зонды.

5. Для придания биосенсору с иммобилизованным авидином или стрептавидином специфичности к анализируемым биомолекулам осуществляют реакцию между иммобилизованным на биосенсоре авидином или стрептавидином с биотинилированными аффинными биорецепторами, для чего приводят биосенсор в контакт с раствором биотинилированных аффинных биорецепторов после осуществления иммобилизации авидина или стрептавида в/на пленку электропроводящего полимера или непосредственно перед контактом биосенсора с образцом исследуемой жидкости, или в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

6. Для расширения области применения анализа за счет осуществления анализа малых и незаряженных биомолекул и возможности получения строгих количественных результатов используют дополнительные меченые биорецепторы - биорецепторы, специфичные либо к биотинилированным аффинным биорецепторам, либо к анализируемым биомолекулам, при этом молекулы которых конъюгированы с зарядовой или ферментной метками.

7. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени контакт

биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

8. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени контакт биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами после контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости или в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости или, в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости и одновременно с биотинилированными аффинными биорецепторами.

9. Составляют электрохимическую измерительную ячейку, приводя биосенсор и электрод сравнения, связанные посредством измерительного устройства, в контакт с буферным раствором.

10. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени регистрацию посредством измерительного устройства величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

11. Скачкообразно изменяют ионную силу буферного раствора, повышая или понижая ее, или для увеличения чувствительности анализа и расширения области его применения изменяют состав буферного раствора.

12. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени регистрацию посредством измерительного устройства изменение величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения при изменении ионной силы или состава буферного раствора.

13. На основании количественных характеристик изменения величины изменения потенциала биосенсора при изменении ионной силы или состава буферного раствора делают вывод о количественном содержании анализируемых биомолекул в исследуемой жидкости.

Новизна заявленного технического решения состоит в том, что заявителем предложен новый способ с новой совокупностью признаков, отличающихся от прототипов.

Все признаки, характеризующие заявленный объект и внесенные в формулу изобретения являются существенными, т.к. только благодаря их совокупности достигается тот положительный эффект, который ожидается от использования заявленного технического решения.

Кроме того, указанные отличительные признаки проявляют новые свойства, неизвестные в науке и технике.

Таким образом, данное техническое решение соответствует критериям изобретения "новизна", "положительный эффект" и "существенные отличия".

Заявленный способ поясняется чертежами, где изображены основные этапы его осуществления.

Фиг. 1А: нанесение на поверхность потенциметрического электрода (1) пленки электропроводящего полимера (2) и иммобилизация в нее молекул авидина или стрептавида (3).

Фиг. 1В: нанесение на поверхность потенциметрического электрода (1) пленки электропроводящего полимера (2) и иммобилизация на нее молекул авидина или

стрептавидина (3).

Фиг. 2А: придание биосенсору специфичности к анализируемым антигенам путем проведения реакции между иммобилизованным в пленку авидином или стрептавидином с антителами (4), конъюгированными с биотином (5).

Фиг. 2В: придание биосенсору специфичности к анализируемым антителам путем проведения реакции между иммобилизованным в пленку авидином или стрептавидином с антигеном (6), конъюгированными с биотином (5).

Фиг. 2С: придание биосенсору специфичности к анализируемым молекулам ДНК путем проведения реакции между иммобилизованным в пленку авидином или стрептавидином с ДНК-зондом (7), конъюгированным с биотином (5).

Фиг. 3А: осуществление контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости, содержащей антигены (6), специфичные к иммобилизованным на биосенсоре биотинилированным антителам.

Фиг. 3В: осуществление контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости, содержащей антитела (4), специфичные к иммобилизованным на биосенсоре биотинилированным антигенам.

Фиг. 3С: осуществление контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости, содержащей молекулы ДНК (8), специфичные к иммобилизованным на биосенсоре ДНК-зондам.

Фиг. 4А: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с зарядовой меткой (10) дополнительных биорецепторов (9), специфичных к анализируемому антигену.

Фиг. 4В: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с зарядовой меткой (10) дополнительных биорецепторов (11), специфичных к анализируемому антителам.

Фиг. 5А: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с зарядовой меткой (10) дополнительных биорецепторов (12), специфичных к биотинилированным антителам.

Фиг. 5В: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с зарядовой меткой (10) дополнительных биорецепторов (13), специфичных к биотинилированным антигенам.

Фиг. 6А: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с ферментной меткой (14) дополнительных биорецепторов (9), специфичных к анализируемому антигену.

Фиг. 6В: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с ферментной меткой (14) дополнительных биорецепторов (11), специфичных к анализируемому антителам.

Фиг. 7А: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с ферментной меткой (14) дополнительных биорецепторов (12), специфичных к биотинилированным антителам.

Фиг. 7В: осуществление контакта биосенсора с раствором конъюгированных с ферментной меткой (14) дополнительных биорецепторов (13), специфичных к биотинилированным антигенам.

Фиг. 8А: проведение анализа, с

последовательным осуществлением контакта биосенсора с раствором биотинилированных биорецепторов [фиг. 8А1], с образцом исследуемой биологической жидкости [фиг. 8А2], с раствором дополнительных меченых биорецепторов [фиг. 8А3] и с последующим измерением потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения [фиг. 8А4].

Фиг. 8В: проведение анализа, при котором вначале осуществляют контакт биосенсора с раствором биотинилированных биорецепторов [фиг. 8В1], далее осуществляют контакт биосенсора с образцом исследуемой биологической жидкости, в который добавляют раствор дополнительных меченых биорецепторов [фиг. 8В2], и далее осуществляют измерение потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения [фиг. 8В3].

Фиг. 8С: проведение анализа, при котором вначале в образец исследуемой биологической жидкости добавляют раствор биотинилированных биорецепторов [фиг. 8С1], далее осуществляют контакт биосенсора с образцом исследуемой биологической жидкости, содержащим биотинилированные биорецепторы и дополнительные меченые биорецепторы [фиг. 8С2], и далее осуществляют измерение потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения [фиг. 8С3].

Фиг. 9: кривые изменения потенциала биосенсора при скачкообразном изменении ионной силы или состава буферного раствора (в координатах "милливольты - время") после инкубации биосенсора с образцом исследуемой биологической жидкости, не содержащим специфичного к биотинилированным биорецепторам компонента (кривая 1) и после инкубации биосенсора с образцом исследуемой биологической жидкости, содержащим специфичный к биотинилированным биорецепторам компонент (кривая 2).

Фиг. 10: калибровочный график зависимости разности в милливольтмах между фоновым и конечным потенциалами биосенсора, измеренными относительно потенциала электрода сравнения, от концентрации HBsAg в образцах сывороток крови.

Фиг. 11: кривая зависимости разности в милливольтмах между фоновым и конечным потенциалами биосенсора, измеренными относительно потенциала электрода сравнения, от разведения HBsAg-позитивной сыворотки крови.

Фиг. 12: кривые статистического распределения величины разности в милливольтмах между фоновым и конечным потенциалами биосенсора, измеренными относительно потенциала электрода сравнения, при использовании образцов, содержащих ДНК комплементарную и некомплементарную к иммобилизованному на биосенсорах ДНК-зонду.

Новизна заявленного технического решения состоит в том, что заявителем предложен новый способ с новой совокупностью признаков, отличающихся от прототипа.

Все признаки, характеризующие заявленный объект и внесенные в формулу изобретения, являются существенными, т.к.

только благодаря их совокупности достигается тот положительный эффект, который ожидается от использования заявленного технического решения.

Кроме того, указанные отличительные признаки проявляют новые свойства, неизвестные в науке и технике.

Таким образом, данное техническое решение соответствует критериям изобретения "новизна", "положительный эффект" и "существенные отличия".

Заявленный способ осуществляют следующим образом.

1. Наносят на поверхность потенциометрического электрода пленку электропроводящего полимера.

Основными требованиями, предъявляемыми к материалу электрода, используемого для осуществления заявленного способа, являются наличие электропроводности и устойчивость в водных растворах. В качестве электрода можно использовать как стандартные потенциометрические электроды, так и специально сконструированные для осуществления заявленного способа.

Перед проведением электрохимического синтеза электроды предварительно дважды промывают в 2-5%-ном растворе КОН в течение 30 минут, далее ополаскивают деионизованной водой и дважды промывают в ацетоне в течение 5 минут, после чего высушивают на воздухе при комнатной температуре в течение 20 минут. После этого электроды помещают в аппарат Сокслета, где промывают горячим изопропиловым спиртом в течение 0,5 - 2 часов. Затем электроды извлекают из аппарата Сокслета и высушивают в парах изопропилового спирта. Далее электроды помещают в герметично закрытую посуду, где хранят не более 1,5 - 2 часов до начала процесса электрохимического синтеза.

Выбор электропроводящих полимеров, таких, как полипиррол, политиофен, полифуран, для формирования биосенсора обусловлен следующими их свойствами: высокой химической стойкостью, высокой электропроводностью, простотой и технологичностью получения пленок полимеров путем электрохимического синтеза, возможностью варьирования свойств образующейся полимерной пленки (структуры, электропроводности, ион-чувствительности и т.п.) на стадии ее синтеза.

Электрохимический синтез пленки электропроводящего полимера осуществляют из раствора, содержащего мономер, полярный растворитель и фоновый электролит.

В качестве мономера используют пиррол, тиофен, фуран, анилин. В качестве полярного растворителя используют деионизованную воду. Мономер перегоняют в стандартной аппаратуре с водяным охлаждением при атмосферном давлении при температуре 135-140°C и хранят в герметичной посуде темного стекла под N<sub>2</sub> при температуре -20 ± -5°C. Концентрацию мономера в растворе для электрохимической полимеризации варьировать в зависимости от типа анализа в пределах 0,3 - 1,0 М. После смешивания компонентов раствора его обрабатывают ультразвуком в течение 2-4 минут. Непосредственно перед проведением

синтеза удаляют O<sub>2</sub> из раствора путем пропускания через него N<sub>2</sub> в течение 10 - 15 минут.

5 Электрохимический синтез проводят в трехэлектродной электрохимической ячейке, включающей рабочий электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод. В качестве рабочего электрода используют предварительно подготовленный, так как это было описано выше, потенциометрический

10 металлический электрод, в качестве вспомогательного электрода - золотую или платиновую проволоку, а в качестве электрода сравнения - хлорсеребряный электрод. Синтез осуществляют при помощи

15 потенциостата, используя режим непрерывной развертки напряжения на рабочем электроде. В зависимости от желаемой толщины полимерной пленки и ее свойств, варьируют нижнюю границу развертки потенциала, верхнюю границу развертки потенциала, скорость развертки напряжения и количество

20 циклов развертки в пределах от -500 мВ до +800 мВ, от +1000 мВ до +2000 мВ (относительно Ag/AgCl-электрода сравнения), 25 - 200 мВ/с и 3-30 соответственно. Процесс образования пленки электропроводящего полимера контролируют по виду вольтамперной кривой и суммарному количеству электричества, прошедшего через рабочий электрод, при помощи самописца или

30 другого регистрирующего прибора, соединенного с потенциостатом. При этом следят, чтобы величина прошедшего через рабочий электрод электричества для первого и последующих циклов не отличалась более чем на 15%. 2. Для увеличения чувствительности анализа и уменьшения времени его

35 проведения проводят допирование электропроводящего полимера на стадии его электрохимического синтеза. Допирование осуществляют противоионами, обладающими наибольшей способностью к ионному обмену с окружающим полимер раствором. Для этого в качестве фонового электролита при

40 приготовлении раствора для электрохимической полимеризации используют соли, анионы которых обладают большим ионным радиусом. Как было показано в ряде работ [4, 5], легкость ионного обмена и скорость

45 достижения ионного равновесия для электропроводящих полимеров, погруженных в раствор, в основном зависит от размера противоиона, введенного на стадии электрохимического синтеза: чем больше ионный радиус противоиона, тем легче протекают ионообменные реакции и быстрее устанавливается равновесное состояние, а это напрямую связано с величиной и

50 скоростью изменения потенциала системы "металлический электрод - электропроводящий полимер" в ответ на изменение ионного состава раствора [6].

55 В качестве солей, анионы которых обладают большим ионным радиусом, используют додецилсульфат натрия (SDS), декстрансульфат натрия и т.п., концентрацию которых в растворе для электрохимической полимеризации варьируют в зависимости от

60 типа анализа в пределах 0,005 - 0,05 М. 3. Осуществляют иммобилизацию в/на пленку электропроводящего полимера авидина или стрептавидина.



Авидин или стрептавидин используют с целью максимального увеличения срока хранения работоспособного биосенсора, повышения технологичности процесса получения биосенсора, а также с целью увеличения достоверности получаемых в ходе анализа результатов.

Одной из основных проблем, характерных для электрохимических методов анализа с использованием биосенсоров, является проблема длительного сохранения нативных свойств иммобилизованных на биосенсоре биорецепторов. Относительный прогресс в этой области достигнут лишь для ограниченного ряда ферментных биосенсоров [7]. Для большинства же известных из литературы электрохимических биосенсоров с использованием аффинных рецепторов [8, 9, 10] срок сохранения их работоспособности просто не указывается, что косвенным образом свидетельствует о его крайне малой величине. Особенно остро проблема сохранения нативных свойств иммобилизованных биорецепторов стоит в том случае, когда в качестве биорецепторов используются антитела, что связано с их высокой конформационной изменчивостью.

С другой стороны, известно, что антитела и другие биорецепторы сохраняют свою работоспособность в течение весьма продолжительного времени при хранении их в виде концентрированных растворов, поэтому задача длительного хранения биосенсоров без потери их рабочих характеристик может быть решена путем проведения быстрой иммобилизации аффинных биорецепторов непосредственно перед осуществлением контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости или даже в ходе этого контакта.

В заявленном изобретении эту задачу решают, используя хорошо известную аффинную пару "авидин (стрептавидин) - биотин". Авидин, белок, выделяемый из сырых яиц, содержит в своей структуре четыре одинаковые пептидные субъединицы, каждая из которых имеет один сайт связывания молекулы биотина. Авидин, выделенный из некоторых бактериальных культур, например, *Streptomyces avidinii*, носит название стрептавидин. Авидин и стрептавидин обладают одинаковыми способностями быстро и необратимо связывать молекулы биотина и могут быть равнозначно использованы для осуществления заявленного способа.

Исследованиями, проведенными авторами заявленного изобретения, было показано, что авидин и стрептавидин, иммобилизованные в пленку электропроводящего полимера, сохраняют свои нативные свойства в течение длительного периода времени (до одного года) и в течение всего этого периода могут быть использованы для связывания с биотином, конъюгированным с аффинными биорецепторами.

Помимо увеличения срока хранения биосенсора иммобилизация авидина или стрептавидина в/на пленку электропроводящего полимера также существенно увеличивает достоверность получаемых в ходе анализа результатов за счет снижения неспецифических взаимодействий компонентов исследуемой жидкости в ходе контакта с ней биосенсора, что связано с блокировкой молекулами

авидина или стрептавидина свободной поверхности электропроводящего полимера, а также повышает технологичность процесса изготовления биосенсора, позволяя избежать дополнительной процедуры блокировки его поверхности.

Иммобилизацию авидина или стрептавидина в/на пленку электропроводящего полимера на биосенсоре осуществляют либо на стадии электрохимического синтеза электропроводящего полимера (фиг. 1А), либо по его завершении (фиг. 1В). Выбор конкретного способа иммобилизации обусловлен конкретным типом анализа.

В первом случае раствор авидина или стрептавидина добавляют в раствор для электрохимического синтеза непосредственно перед проведением синтеза. Время хранения конечного раствора не должно превышать 30 минут. Концентрацию авидина или стрептавидина в растворе в зависимости от конкретного типа анализа варьируют в пределах 5,00 - 100,00 мкг/мл.

Электрохимический синтез электропроводящего полимера из раствора, содержащего авидин или стрептавидин, осуществляют так, как это было описано выше. По завершении электрохимического синтеза полученный биосенсор промывают последовательно деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором и далее в зависимости от типа анализа либо помещают в специальный буферный раствор для хранения, содержащий ингибиторы микробного роста, либо высушивают на обеспыленном воздухе при комнатной температуре.

Во втором случае биосенсор после завершения процесса электрохимического синтеза промывают деионизованной водой и помещают в свежеприготовленный 0,02 М карбонатный буферный раствор, где выдерживают в течение 15 - 60 минут. Далее осуществляют контакт биосенсора со свежеприготовленным 0,02 М карбонатным буферным раствором, содержащим авидин или стрептавидин в концентрации 1,00 - 50,00 мкг/мл, погружая биосенсор в емкость, заполненную раствором, или нанося каплю раствора на поверхность биосенсора.

Инкубацию биосенсора с раствором авидина или стрептавидина проводят в течение 1 - 24 часов при температуре +4°C. После завершения инкубации биосенсор промывают деионизованной водой и помещают на 1 - 4 часа в 0,1 М фосфатно-солевой буферный раствор. Далее в зависимости от типа анализа биосенсор либо помещают в специальный буферный раствор для хранения, содержащий ингибиторы микробного роста, либо высушивают на обеспыленном воздухе при комнатной температуре.

4. Используют биотинилированные аффинные биорецепторы.

Биотин (витамин Н, hexahydro-2-oxo-1H-thieno [3, 4] umidoazole-4-pentanoic acid) является фактором роста и присутствует в очень небольших количествах во всех клетках живых организмов. Способность молекул биотина вступать в аффинную реакцию с молекулами авидина или стрептавидина и образовывать в ходе этой реакции практически недиссоциирующие комплексы "биотин -

авидин" (константа диссоциации -  $10^{-15}$  М/л) хорошо известна, и на ней основан ряд методов анализа, в основном, в области генной инженерии [11, 12].

Конъюгирование биотина с соответствующими биорецепторами - биотинилирование - проводят по одной из известных методик, например, описанной в [12]. Полученные биотинилированные аффинные биорецепторы переводят путем диализа в буферный раствор для хранения, содержащий ингибиторы микробного роста, и хранят в герметично закрытой посуде при температуре +4°C.

В зависимости от типа анализа в качестве аффинных биорецепторов используют моноклональные или поликлональные антитела (фиг. 2А), антигены (фиг. 2В), однопептидные молекулы ДНК (фиг. 2С) и пр.

Исследованиями, проведенными как авторами заявленного изобретения, так и другими авторами [12], было показано, что биотинилирование биорецепторов не приводит к изменению их свойств (аффинности, способности храниться и др.) по сравнению с их небитинилированными аналогами.

Для осуществления ряда анализов, например, для анализа различных иммуноглобулинов, используют готовые коммерчески доступные препараты биотинилированных антител различной специфичности, например, "Anti-Human IgG or Anti-Human IgA goat biotin-labeled antibodies" производства Calbiochem-Novabiochem, США.

Одним из существенных преимуществ использования биотинилированных биорецепторов является возможность для пользователя самостоятельно определять нужную ему специфичность биосенсора, проводя реакцию между иммобилизованным на биосенсоре авидином или стрептавидином с соответствующими биотинилированными биорецепторами.

5. Для придания биосенсору с иммобилизованным авидином или стрептавидином специфичности к анализируемым биомолекулам осуществляют реакцию между иммобилизованным на биосенсоре авидином или стрептавидином с биотинилированными аффинными биорецепторами, для чего приводят биосенсор в контакт с раствором последних.

Контакт биосенсора с биотинилированными аффинными биорецепторами в зависимости от типа анализа осуществляют различными способами: непосредственно после осуществления иммобилизации авидина или стрептавида в/на пленку электропроводящего полимера, непосредственно перед контактом биосенсора с образцом исследуемой жидкости (фиг. 8А1, фиг. 8В1), в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости (фиг. 8С2).

Первый способ используют в тех случаях, когда время между изготовлением биосенсора и проведением анализа не превышает нескольких суток. Контакт биосенсора с раствором биотинилированных аффинных биорецепторов осуществляют при комнатной температуре либо путем погружения биосенсора в емкость, заполненную

раствором, либо нанося каплю раствора на поверхность биосенсора. Концентрация биотинилированных аффинных биорецепторов в растворе составляет 0,1 - 100 мкг/мл в зависимости от их типа и конкретных особенностей. Время контакта составляет 3 - 15 минут. После этого биосенсор промывают 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором и переносят в буферный раствор для хранения.

Второй способ используют в случаях, когда биосенсор хранят в течение длительного периода времени. Контакт биосенсора с раствором биотинилированных аффинных рецепторов осуществляют аналогично тому, как это было описано выше. По завершении контакта биосенсора с раствором биотинилированных аффинных биорецепторов его сразу же приводят в контакт с образцом исследуемой жидкости (фиг. 8А1, фиг. 8В1).

Третий способ осуществления контакта биосенсора с раствором биотинилированных аффинных биорецепторов будет описан ниже.

6. Используют дополнительные меченые биорецепторы - биорецепторы, специфичные либо к биотинилированным аффинным биорецепторам, либо к анализируемому компоненту исследуемой жидкости, молекулы которых конъюгированы с зарядовой или ферментной меткой.

Как было показано в работах [13, 14, 15, 16] и в [3], отклик (величина и скорость изменения потенциала) биосенсора с полимерной пленкой, содержащей биорецепторы, в ответ на скачкообразное изменение ионной силы окружающего раствора (так называемый "метод ионного скачка" или "метод ионного удара") определяется в значительной степени величиной заряда полимерной пленки. Заряд полимерной пленки обусловлен помимо материала, из которого она выполнена, зарядом молекул иммобилизованных в нее биорецепторов. Если заряд биорецепторов вследствие аффинной реакции со специфичными к ним биомолекулами изменится, то изменится и отклик биосенсора в ответ на скачкообразное изменение ионной силы окружающего раствора, проведенной после контакта биосенсора с исследуемой жидкостью. Следует отметить, что поскольку вследствие амфотерного характера большинства биомолекул заряд биорецепторов зависит от величины рН раствора, большое значение приобретает сохранение постоянства величины его рН при осуществлении метода ионного удара.

Таким образом, на основании измерения отклика биосенсора при осуществлении метода ионного удара, осуществленного до и после контакта биосенсора с исследуемой жидкостью, можно сделать вывод о наличии в ней биомолекул, специфичных к биорецепторам, иммобилизованным на биосенсоре. В идеальном случае изменение заряда биорецепторов в мембране и, следовательно, изменение отклика биосенсора прямо пропорционально концентрации в исследуемой жидкости биомолекул, специфичных к биорецепторам, иммобилизованным на биосенсоре. Однако, в реальных условиях заряд одних и тех же биомолекул может существенно варьировать, что приводит к получению не вполне

корректных количественных результатов. К тому же не всегда аффинные реакции сопровождаются изменением заряда биорецепторов. Как правило, это происходит при анализе малых или незаряженных антигенов [14]. Поэтому при осуществлении заявленного способа используют дополнительные биорецепторы, конъюгированные с зарядовой меткой, заряд которой гарантированно превышает заряд анализируемых биомолекул. Дополнительные биорецепторы способны связываться либо с биорецепторами на биосенсоре, либо с прореагировавшими с биорецепторами анализируемыми биомолекулами и тем самым гарантированно изменять заряд полимерной пленки биосенсора. Это позволяет получить корректные количественные результаты и существенно расширить спектр анализируемых биомолекул за счет возможности проводить анализ малых и незаряженных биомолекул.

В качестве зарядовой метки, конъюгированной с дополнительными биорецепторами, используют латексные микросферы, которые могут быть либо синтезированы по одной из известных методик [17], либо получены в готовом виде в виде коммерчески доступного препарата от специализированного производителя, например, Polysciences Inc., США.

Конъюгирование дополнительных биорецепторов с латексными микросферами осуществляют по одной из известных методик, например, описанной в [18] или при помощи коммерчески доступных специальных наборов для конъюгации антител с латексными микросферами, например, "Carbodiimide Kit for Carboxylated Beads" производства Polysciences Inc., США.

Альтернативным использованию дополнительных биорецепторов, конъюгированных с зарядовой меткой, является способ, предусматривающий использование дополнительных биорецепторов, конъюгированных с ферментной меткой, которые также способны связываться либо с биорецепторами на биосенсоре, либо с прореагировавшими с биорецепторами анализируемыми биомолекулами.

В качестве ферментной метки используют пероксидазную, уреазную, глюкозооксидазную, щелочную фосфатазную и другие метки.

Конъюгирование дополнительных биорецепторов с ферментными метками осуществляют по одной из известных методик, описанных в [19].

Используют также широко представленные на рынке коммерческие препараты конъюгатов биорецепторов различной специфичности с ферментными метками.

В зависимости от типа анализа в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют поликлональные или моноклональные антитела. Выбор специфичности меченых антител определяется следующим.

В случае, когда в качестве биотинилированных аффинных биорецепторов используют антитела, а анализируемый антиген является моновалентным, т.е. имеет только один сайт связывания, используют меченые антитела, специфичные к биотинилированным

антителам (фиг. 5A).

В случае, когда в качестве биотинилированных аффинных биорецепторов используют антитела, а анализируемый антиген является поливалентным, т.е. имеет более чем один сайт связывания, используют меченые антитела, специфичные к анализируемому антигену (фиг. 6A). При этом биотинилированные и меченые антитела должны быть специфичны к разным сайтам связывания антигена.

В случае, когда в качестве биотинилированных аффинных биорецепторов используют антигены, а анализируемыми биомолекулами являются антитела, используют антитела, специфичные либо к биотинилированному антигену (фиг. 5B), либо к анализируемым антителам (к Fc-фрагменту) (фиг. 6B). Выбор антител конкретной специфичности в этом случае зависит от конкретного типа анализа.

В случае, когда в качестве биотинилированных аффинных биорецепторов используют ДНК-зонды, а анализируемым компонентом являются фрагменты молекул ДНК, применение дополнительных меченых биорецепторов нецелесообразно, поскольку реакция гибридизации гарантированно сопровождается изменением заряда ДНК-зонда.

7. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени контакт биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

В качестве исследуемых жидкостей используют в зависимости от типа анализа цельную кровь, сыворотку и плазму крови, мочу, лимфу и т.п.

В качестве емкости для образца используют лунки микротитрационного планшета, микроцентрифужные пробирки или другую подходящую по размеру посуду. Объем образца составляет 5,00 - 200,00 мкл в зависимости от геометрических размеров биосенсора.

Контакт биосенсора с образцом проводят при температуре 37 - 40°C при постоянном перемешивании.

Время контакта биосенсора с образцом в зависимости от типа и требуемой чувствительности анализа составляет 5 - 60 минут.

Контакт биосенсора с образцом исследуемой жидкости в зависимости от типа анализа осуществляют различными способами:

непосредственно после контакта биосенсора с раствором биотинилированных биорецепторов (фиг. 8A2);

одновременно с контактом биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами (фиг. 8B2);

одновременно с контактом биосенсора с биотинилированными антителами и дополнительными мечеными биорецепторами (фиг. 8C2).

В первом случае биосенсор сразу же после завершения контакта с раствором биотинилированных биорецепторов переносит в емкость с образцом исследуемой жидкости.

Второй и третий способы осуществления контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости будут описаны ниже.

8. Осуществляют в течение

фиксированного отрезка времени контакт биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов.

С целью устранения возможных неспецифических взаимодействий компонентов исследуемых биологических жидкостей с поверхностью биосенсора, а также неспецифическую сорбцию дополнительных меченых биорецепторов на поверхность биосенсора, которые приводят к искажению получаемых результатов, в раствор дополнительных меченых биорецепторов дополнительно вводят различные блокирующие агенты, такие, как бычий сывороточный альбумин (0,5 - 5%), человеческий сывороточный альбумин (0,5 - 5 вес.%), разбавленную нормальную сыворотку человека или животных (5 - 10 об.%), желатозу (10 - 50 об.%) и т.п. При этом одновременно с взаимодействием дополнительных меченых биорецепторов с биосенсором происходит блокировка его свободной поверхности.

Контакт биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов в зависимости от типа анализа осуществляют различными способами:

после контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости (фиг. 8А3);

в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости (фиг. 8В2);

в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости и одновременно с биотинилированными аффинными биорецепторами (фиг. 8С2).

Первый способ используют, в основном, в случаях, когда анализируемыми биомолекулами являются поливалентные антигены. Он позволяет обеспечить высокую специфичность и чувствительность анализа при относительно большом общем времени его проведения. Контакт биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов осуществляют путем погружения биосенсора в емкость, заполненную раствором. Емкость и объем раствора используют аналогичные тем, какие были использованы при осуществлении контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости. Концентрация дополнительных меченых биорецепторов в растворе составляет 1 - 100 мкг/мл в зависимости от их типа, конкретных особенностей и требуемой чувствительности анализа. Контакт проводят в течение 3 - 30 минут при температуре 37 - 40°C и при постоянном перемешивании раствора.

Второй способ также используют в случаях, когда анализируемыми биомолекулами являются поливалентные антигены. Однако, он позволяет существенно сократить общее время проведения анализа и упростить технологию его проведения. В этом случае раствор дополнительных меченых биорецепторов добавляют в образец исследуемой жидкости и далее осуществляют контакт биосенсора с этим образцом так, как это было описано выше в п. 7. Концентрация дополнительных меченых биорецепторов в образце при этом составляет 1 - 100 мкг/мл в зависимости от их типа, конкретных особенностей и требуемой чувствительности анализа. Время контакта составляет 5 - 60 минут.

Третий способ осуществления контакта

биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов является наиболее простым в технологическом исполнении и используется для анализа моновалентных и поливалентных антигенов и антител. В этом случае аффинные реакции протекают в гомогенном растворе, что обеспечивает максимально полный контакт взаимодействующих биомолекул и позволяет достичь максимальную чувствительность анализа и минимальное общее время его проведения. В этом случае в образец исследуемой жидкости одновременно или последовательно добавляют раствор биотинилированных аффинных биорецепторов и раствор дополнительных меченых биорецепторов. Концентрации биотинилированных аффинных биорецепторов и дополнительных меченых биорецепторов в образце исследуемой жидкости составляют при этом 0,1 - 100 и 1 - 100 мкг/мл соответственно. Емкость с образцом исследуемой жидкости после добавления в нее биотинилированных аффинных биорецепторов и дополнительных меченых биорецепторов помещают в термостат и выдерживают там при температуре 37 - 40°C в течение 5 - 60 минут при постоянном перемешивании. После этого образец исследуемой жидкости приводят в контакт с биосенсором, покрытым пленкой электропроводящего полимера с иммобилизованным авидином или стрептавидином, для чего либо погружают биосенсор в емкость с образцом, либо наносят каплю образца на поверхность биосенсора. Контакт биосенсора с образцом осуществляют в течение 3 - 30 минут при температуре 37 - 40 °С.

9. Составляют электрохимическую измерительную ячейку, приводя биосенсор и электрод сравнения, связанные посредством измерительного устройства, в контакт с буферным раствором.

В качестве электрода сравнения используют либо коммерчески доступные электроды сравнения, подходящие по размеру, либо специально сконструированные для осуществления заявленного изобретения.

В качестве измерительного прибора используют стандартные приборы для потенциометрических измерений или потенциостат.

Используют также специально сконструированные для осуществления заявленного способа IBM PC совместимые электронные измерительные устройства, работающие под управлением специализированной программы. После запуска программы производится начальное тестирование электронного измерительного устройства. После завершения самотестирования программа переходит в режим выбора режима работы: измерение, работа с базой данных или завершение работы.

Связь биосенсора и электрода сравнения с измерительным устройством осуществляют посредством специального держателя, снабженного электрическими контактами для подключения биосенсора и электрода сравнения и связанного с измерительным устройством посредством кабеля или иным образом. Используют также держатель, конструктивно объединенный с

измерительным устройством, что позволяет миниатюризовать общие размеры измерительной системы.

В качестве рабочего раствора используют водные буферные растворы - фосфатно-солевой, Tris-HCl, карбонатно-бикарбонатный, ацетатный, боратный и др. Объем рабочего раствора в электрохимической ячейке может составлять от 50 до 5000 мкл в зависимости от геометрических размеров биосенсора.

В качестве емкости для буферного раствора используют любую подходящую по размерам емкость, выполненную из материала с минимальными адсорбционными свойствами, например, лунку стандартного микротитрационного планшета.

Другим способом осуществления заявленного изобретения является вариант, когда используют проточную ячейку малого объема ( $< 1 \text{ см}^3$ ), конструктивно объединенную с держателем биосенсора и электрода сравнения, через которую посредством перистальтического насоса или иным образом непрерывно прокачивают буферный раствор.

10. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени регистрацию посредством измерительного устройства величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения (фиг. 8А4, фиг. 8В3, фиг. 8С3).

Регистрацию осуществляют либо при помощи самописца, соединенного с прибором для потенциометрических измерений или потенциостатом, либо, если используется IBM PC совместимое электронное измерительное устройство, при помощи специальной программы.

После запуска программы в режиме измерения на дисплей измерительного устройства выводится окно для ввода посредством любых символов и цифр имени оператора, шифра анализируемого образца исследуемой биологической жидкости и даты его отбора. Эти данные, которые программа впоследствии заносит в базу данных, служат формальными параметрами для идентификации и обработки записей в базе данных. Кроме указанных параметров, к каждому образцу автоматически подставляется дата проведения его анализа.

После введения шифра образца программа переходит в режим измерения потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения, производимого через заданные интервалы времени (обычно через каждые 3 - 5 с). Результат каждого измерения выводится на дисплей измерительного устройства в виде точки в координатах "сигнал биосенсора - время".

Регистрацию величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения осуществляют для определения фонового значения потенциала  $V_1$  биосенсора, а также для оценки дрейфа фонового потенциала ( $\gamma$ ) биосенсора, который вычисляется путем линеаризации полученной кривой "величина потенциала биосенсора - время регистрации" по методу наименьших квадратов.

По окончании регистрации потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения программа выдает

сообщение о необходимости перейти к следующей стадии анализа.

Время величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения регистрации составляет 10 - 100 с.

11. Скачкообразно изменяют величину ионной силы буферного раствора или его состав.

В случае, когда в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют конъюгированные с зарядовой меткой антитела, скачкообразно изменяют величину ионной силы буферного раствора, повышая или понижая ее.

Изменение величины ионной силы буферного раствора осуществляют либо путем переноса держателя с установленными в нем биосенсором и электродом сравнения из исходного буферного раствора в буферный раствор того же состава, но с контрастной ионной силой, либо непосредственно вводя буферный раствор с контрастной ионной силой в емкость с исходным буферным раствором, в которой находятся биосенсор и электрод сравнения. Когда используют проточную ячейку, изменение величины ионной силы буферного раствора осуществляют путем вытеснения из ячейки исходного буферного раствора буферным раствором с контрастной ионной силой.

В зависимости от типа анализа буферный раствор с контрастной ионной силой может иметь величину ионной силы, большую или меньшую по сравнению с исходным буферным раствором. Разница в величинах ионной силы достигается за счет различной концентрации в буферных растворах солей сильных кислот и оснований, например KCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и т.п., использование которых обусловлено тем, что при добавлении в раствор они диссоциируют полностью и не сдвигают величину pH раствора. Концентрация солей в буферном растворе составляет 0,01 - 1,0 М.

В случае, когда в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют конъюгированные с ферментной меткой антитела, изменяют состав буферного раствора путем добавления в него соответствующего субстрата, реагирующего с ферментной меткой. При этом либо держатель с установленными в нем биосенсором и электродом сравнения переносят из емкости с исходным буферным раствором в емкость с буферным раствором, содержащим субстрат, либо вводят раствор субстрата непосредственно в емкость с исходным буферным раствором, в которой находятся биосенсор и электрод сравнения. Когда используют проточную ячейку, изменение состава буферного раствора осуществляют путем вытеснения из ячейки исходного буферного раствора буферным раствором, содержащим субстрат.

В качестве субстрата используют ABTS ( $\{2,2\text{'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]}\}$ ), ТМВ (3,3', 5,5'-Tetraethylbenzidine), DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (когда используют антитела, конъюгированные с пероксидазной меткой), мочевины (когда используют антитела, конъюгированные с уреазной меткой), p-NPP (p-Nitrophenyl Phosphate), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) (когда используют антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой), глюкозу (когда

используют антитела, конъюгированные с глюкозооксидазой) и др.

12. Осуществляют в течение фиксированного отрезка времени регистрацию посредством измерительного устройства изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения при скачкообразном изменении ионной силы или состава буферного раствора.

Регистрацию осуществляют либо при помощи самописца, соединенного с прибором для потенциометрических измерений или потенциостатом, либо, если используется IBM PC совместимое электронное измерительное устройство, при помощи специальной программы.

В последнем случае программа осуществляет измерение потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения через заданные интервалы времени (обычно через каждые 3 - 5 с). Результат каждого измерения выводится на дисплей измерительного устройства в виде точки в координатах "сигнал биосенсора - время" (фиг. 9).

В том случае, когда меняют ионную силу буферного раствора, получаемая кривая изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения обычно имеет параболическую форму и представляет собой отклик биосенсора на изменение ионной силы буферного раствора, который модулируется величиной суммарного заряда (изоэлектрической точки) пленки электропроводящего полимера.

При этом:

в случае, когда используют меченые антитела, специфичные к биотинилированным антителам или антигенам, суммарный заряд полимерной пленки изменяется обратно пропорционально количеству анализируемого компонента;

в случае, когда используют меченые антитела, специфичные к анализируемым антигенам или антителам, суммарный заряд полимерной пленки изменяется прямо пропорционально количеству анализируемого компонента;

в случае, когда анализируемым компонентом являются фрагменты молекул ДНК, суммарный заряд полимерной пленки изменяется прямо пропорционально количеству анализируемого компонента.

В зависимости от конкретного типа анализа время регистрации изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения составляет 30 - 600 с.

По окончании проведения данной стадии осуществления заявленного изобретения программа определяет конечную величину потенциала  $V_2$  биосенсора относительно потенциала электрода сравнения и вычисляет количественные характеристики изменения потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения, которыми являются:

площадь (интеграл), ограниченная полученной кривой изменения во времени величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения  $S_2$ ;

$$S_2 = \int_{T_2} f_2(t) dt,$$

где  $T_2$  - общее время регистрации,  $f_2$  - кривая зависимости "потенциал биосенсора в милливольтгах - время",  $t$  - текущее время регистрации;

или разность в милливольтгах между величинами фонового и конечного потенциалов биосенсора:

$$\delta = V_2 - V_1.$$

13. На основании количественных характеристик изменения величины потенциала биосенсора при изменении ионной силы или состава буферного раствора делают вывод о количественном содержании анализируемых биомолекул в исследуемой жидкости.

В случае, когда используют IBM PC совместимое электронное измерительное устройство, работающее под управлением специального программного обеспечения, полученные в ходе выполнения пп. 10 - 12 значения  $\gamma$ ,  $S_2$  и/или  $\delta$  обрабатываются программой. При этом программа пересчитывает значения с учетом дрейфа нулевой линии  $\gamma$ , полученного в ходе выполнения п. 10, и получает значения

$S_2^{\text{н}}$  и/или  $\delta\gamma$ , которые являются аналитическим результатом, на основании которого делают заключение о количестве анализируемого компонента в образце исследуемой биологической жидкости.

После вычисления скорректированных величин  $S_2^{\text{н}}$ ,  $\delta\gamma$ , они поступают в блок программы для окончательной обработки, где она сравнивает их с калибровочной кривой зависимости "аналитический результат - количественное содержание анализируемого компонента" и на основании этого выдает на дисплей сообщение о количественном содержании в образце анализируемого компонента.

Данные для калибровочной кривой закладывают в память измерительного устройства при начальной установке программного обеспечения.

Процесс калибровки осуществляют аналогично тому, как это было описано в пп. 1 - 12, с той лишь разницей, что используют образцы исследуемой биологической жидкости с известными концентрациями анализируемого компонента и при введении шифра образца в ходе выполнения п. 10 указывают количественное содержание в нем анализируемого компонента. Каждые значения  $S_2^{\text{н}}$  и/или  $\delta\gamma$ , полученные на стадии калибровки, сохраняют в специальной калибровочной базе данных. На основании хранящихся в ней данных строят калибровочный график зависимости "аналитический результат - количественное содержание анализируемого компонента".

Заявленное изобретение поясняется следующими примерами.

Использовали следующие реактивы и материалы:

пиррол (> 98%), который был приобретен у Merck (Германия) и перед применением был дважды очищен методом вакуумной перегонки, после чего хранился под  $N_2$  в

непроницаемой для света посуде при температуре +4°C;

гидроксид калия, (KOH, ACS Reagent), гидроксид натрия (NaOH, ACS Reagent), азид натрия (SigmaUltra), сульфат церия (ACS Reagent), хлорид калия (SigmaUltra), хлорид натрия (SigmaUltra), цитрат натрия (ACS Reagent), Трис(гидроксиэтил)аминометан (SigmaUltra), додецилсульфат натрия (SDS, > 99%), декстрансульфат натрия (моп. вес ~ 8000), изопропиловый спирт (ACS Reagent), уксусную кислоту (ACS Reagent), хлористую кислоту (ACS Reagent), N, N-диметилформамид (ACS Reagent), глициновый буферный раствор (0,2 M), "Tris buffered saline tablets", "Phosphate buffered saline tablets", "o-Phenylendiamine dihydrochloride tablets", "Urea hydrogen peroxide/buffer tablets", бычий сывороточный альбумин (RIA grade, fraction V), замороженную бычью сыворотку, стрептавидин (из *Streptomyces avidinii*), NHS-d-биотин, диметилсульфоксид (DMSO, ACS Reagent), биотин-X-X-NHS, кроличьи поликлональные антитела к бычьему сывороточному альбумину, конъюгат козьих моноклональных антител к мышинным IgG с уреазой, одноразовые диализные мешки (MWCO 1,000), которые были приобретены у Sigma Chemical Co. (США);

мышинные моноклональные антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) (5,7 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,01% азида натрия), бараны моноклональные антитела к мышинным IgG (10,0 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,01% азида натрия) и конъюгат мышинных моноклональных антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) с пероксидазой (2,5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,01% азида натрия), которые были приобретены у Sorbent Service Ltd (Россия);

инсулин лиофилизированный (бычий, ~ 20 IU/мг), мышинные моноклональные антитела к инсулину (1,2 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе), которые были любезно предоставлены сотрудниками Кардиологического Научного Центра АМН РФ;

препарат лиофилизованного биотинилированного методом никтрансляции [20] двунитевого ДНК-зонда, препарат лиофилизованной двунитевой ДНК комплементарной к биотинилированному ДНК-зонду, препарат лиофилизованной двунитевой ДНК некомплементарной к биотинилированному ДНК-зонду, препарат лиофилизованной ДНК из спермы лосося и буферный раствор для гибридизации ДНК, которые были любезно предоставлены сотрудниками НИИ биофизики Минздрава;

«Polybead® Sulphate Microspheres» (2,5% Solids-Latex, 0,2 мкм), которые были приобретены у Polysciences Inc. (США);

лавсановую пленку (толщина ~ 500 мкм, Владимирский химкомбинат, Россия);

распыляемую в вакууме хромовую мишень (НИИПИК, России);

фоторезист "ФП-383" (НИИПИК, Россия); деионизованную воду (reagent grade, сопротивление > 18 M Ω), которая была получена при помощи установки Millipore Milli-RO/Milli-Q;

платиновую проволоку толщиной ~ 0,5 мм; "Второй Британский Рабочий Стандарт Поверхностного Антигена Вируса Гепатита В" ("Second British Working Standard for Hepatitis B Surface Antigen") (концентрация HBsAg 0,50 IU/ml), который был любезно предоставлен Северным Лондонским Центром Переливания Крови (North London Blood Transfusion Centre, Великобритания);

концентрат поверхностного антигена вируса гепатита В (концентрация 100 IU/ml), который был любезно предоставлен Северным Лондонским Центром Переливания Крови (North London Blood Transfusion Centre, Великобритания);

образцы HBsAg-позитивных человеческих сывороток), которые были любезно предоставлены Северным Лондонским Центром Переливания Крови (North London Blood Transfusion Centre, Великобритания);

Использовали следующее оборудование: установку вакуумного напыления "УВН" (Россия);

установку нанесения фоторезиста "ПНФ-6Ц" (Россия); самодельный фотошаблон; установку фотоэкспонирования "СТП-300" (Россия);

сухожарный шкаф EU 18 (Jouan, Франция); водяную баню J 12 (Jouan, Франция); самодельный аппарат Сокслета; электронные весы AT 261 с разрешением 0,1 мг (Mettler, Швейцария);

ультразвуковой диспергатор "УД-10" (Россия); ротационный шейкер "Liap" (Latvia); потенциостат-гальваностат "ПИ-50.1" со штатным интегратором и двухкоординатным самописцем (Россия);

двухканальный самописец 2210 (LKB-Prilbori, Швеция); рН-метр Checkmate со штатным комбинированным электродом (Mettler, Швейцария);

96-луночные микротитрационные планшеты из полистирола (Linbro, Великобритания); микропробирки объемом 2,20 мл (Costar, Голландия);

самодельный Ag/AgCl полумикроэлектрод сравнения диаметром ~ 2,5 мм и заполненный насыщенным раствором KCl; Ag/AgCl электрод сравнения N 476370 (Corning, США); термомиксер для микропробирок (Jouan, Франция);

специально сконструированное на базе IBM-совместимого персонального компьютера измерительное устройство, включающее усилитель и аналого-цифровой преобразователь и управляемое специализированной программой;

специально сконструированный держатель для биосенсора и электрода сравнения. Пример N 1.

1.1. Заготавливали подложки из лавсановой пленки размером 60 x 48 мм, отмывали последние в горячем изопропанолу и высушивали в парах изопропанола. Методом магнетронного распыления наносили на подложки слой хрома толщиной 0.05 мкм. На слой хрома наносили фоторезист методом центрифугирования и высушивали при температуре +80°C в течение 20 минут. Экспонировали слой фоторезиста

ультрафиолетом через фотомаску с определенным рисунком. Проявляли слой фоторезиста в растворе КОН с последующим высушиванием при температуре +100°C в течение 20 минут. Получали рисунок из хрома методом травления в растворе сернистой кислоты. Удаляли фоторезист диметилформамидом с последующими отмывкой и высушиванием в парах изопропанола. Высаживали слой золота толщиной 0,50 мкм на рисунок из хрома методом гальванического осаждения из раствора хлорного золота с последующими отмывкой и сушкой в парах изопропанола.

1.2. Полученные электроды дважды промывали в 2-5%-ном растворе КОН в течение 30 минут, далее споласкивали деионизованной водой и дважды промывали в ацетоне в течение 5 минут, после чего высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 20 минут. После этого электроды устанавливали во фторопластовый держатель и помещали в аппарат Сокслета, где промывали горячим изопропиловым спиртом в течение 0,5-2 часов. Затем держатель с электродами извлекали из аппарата Сокслета и электроды высушивали в парах изопропилового спирта. По завершении всех этих процедур электроды помещали в стеклянную герметично закрытую посулу.

1.3. Готовили раствор для хранения биосенсоров, для чего в 1 л деионизованной воды растворяли 8,0 г хлорида натрия, 12,2 г Трис(гидроксиэтил)аминометана, 0,2 г хлорида калия, 0,1 г азидата натрия.

1.4. Осуществляли биотинилирование мышинных моноклональных антител к HBsAg, для чего:

готовили 0,01 М трис-солевой буферный раствор (рН 8,0), содержащий азид натрия, для чего в 1,5 л деионизованной воды растворяли 20 "Tris buffered saline tablets" и 0,15 г азидата натрия;

растворяли 1,0 мг NHS-d-биотина в 1 мл DMSO;

в микропробирку, содержащую 824 мкл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора, добавляли 176 мкл исходного раствора мышинных моноклональных антител к HBsAg;

в полученный раствор добавляли 50 мкл раствора NHS-d-биотина в DMSO, микропробирку со смесью устанавливали в термомиксер и выдерживали 4 часа при температуре +22°C при постоянном перемешивании;

далее смесь диализовали при температуре +4°C в течение ночи против 500-кратного объема 0,01 М трис-солевого буферного раствора, содержащего азид натрия;

полученный раствор биотинилированных антител разливали на аликвоты малого объема (~10 мкл) и хранили при температуре +4°C.

1.5. Осуществляли конъюгирование бараньих мышинных антител к мышинным IgG с латексными микросферами, для чего:

готовили глициновый солевой буферный раствор (рН 8,2), содержащий азид натрия, добавляя к 500 мл деионизованной воды 500 мл 0,2 М глицинового буферного раствора, далее растворяя в полученной смеси 8,5 г хлорида натрия и 0,1 г азидата натрия и доводя значение рН раствора до 8,2 раствором гидроксида натрия;

в микропробирку, содержащую 940 мкл глицинового солевого буферного раствора добавляли 60 мкл исходного раствора бараньих моноклональных антител к мышинным IgG;

5 в полученный раствор добавляли 200 мкл раствора "Polybead® Sulphate Microspheres"; микропробирку со смесью устанавливали в термомиксер и выдерживали 30 минут при температуре +56°C при постоянном перемешивании;

10 далее микропробирку со смесью охлаждали до комнатной температуры и добавляли в нее 0,01 г бычьего сывороточного альбумина;

15 полученный раствор меченых антител разливали на аликвоты малого объема (~5 мкл) и хранили при температуре +4°C.

1.6. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола для чего:

20 2,5 мл свежеперегнанного пиррола и 0,02 г SDS растворяли в 20,0 мл деионизованной воды;

полученный раствор в течение 5 минут обрабатывали ультразвуком;

25 "Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды и в 2 мл полученного раствора растворяли 4,0 мг стрептавидина;

в раствор пиррола и SDS добавляли, предварительно отобрав из него 1 мл, 1 мл раствора стрептавидина в фосфатно-солевом буферном растворе;

30 помещали конечный раствор на ротационный шейкер и перемешивали в течение 10 минут.

1.7. Проводили на электроде электрохимический синтез пленки полипиррола с иммобилизованным в нее стрептавидином, для чего:

35 200 мкл раствора для электрохимической полимеризации помещали в лунку микротитрационного планшета;

40 в лунку погружали электрод, платиновую проволоку и полумикроэлектрод сравнения, подключенные к потенциостату;

циклично развевывали потенциал электрода относительно электрода сравнения в диапазоне +800 - +1800 мВ и скоростью развевки 150 мВ/с;

45 процесс образования пленки полипиррола контролировали по виду вольтамперной кривой при помощи двухкоординатного самописца, подключенного к соответствующим выходам потенциостата, и по суммарному количеству прошедшего через электрод электричества при помощи интегратора и самописца, подключенных к соответствующим выходам потенциостата;

50 по достижении заданной толщины пленки полипиррола (количество циклов развевки потенциала - 6, суммарное количество прошедшего через электрод электричества ~750 мQ) процесс останавливали.

1.8. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола с иммобилизованным в нее стрептавидином, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирку с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

1.9. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли



процедуры, описанные в пп. 1.7. - 1.8., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

1.10. Готовили серию образцов с известной концентрацией HBsAg, для чего "Второй Британский Рабочий Стандарт Поверхностного Антигена Вируса Гепатита В" разводили предварительно размороженной бычьей сывороткой в 2, 4, 8, 10 раз, добавляя к 100, 50, 25, 20 мкл "Второго Британского Рабочего Стандарта Поверхностного Антигена Вируса Гепатита В" 100, 150, 175, 180 мкл бычьей сыворотки соответственно. В качестве образца с нулевым содержанием HBsAg использовали чистую бычью сыворотку. Каждый образец помещали в микропробирку.

1.11. К 19,8 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,2 мл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

1.12. К 19,9 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,1 мл раствора меченых бараньих моноклональных антител к мышинным IgG, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

1.13. Готовили рабочий буферный раствор N 1, для чего "Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды; в полученном растворе растворяли 2 г бычьего сывороточного альбумина и 0,37 г хлорида калия.

1.14. Готовили рабочий буферный раствор N 2, растворяя "Phosphate buffered saline tablet" в 200 мл деионизованной воды;

1.15. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным в нее стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg и инкубировали в них в течение 10 минут.

1.16. По завершении выполнения п. 1.15. биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором биотинилированных антител и помещали в микропробирки с образцами с известной концентрацией HBsAg, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали 15 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

1.17. По завершении выполнения п. 1.16. биосенсоры извлекали из микропробирок с образцами и помещали в микропробирки с раствором меченых бараньих моноклональных антител к мышинным IgG, далее устанавливали их на ротационный шейкер и выдерживали 5 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

1.18. По завершении выполнения п. 1.17. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали течение 3 - 5 с в 0,01 М фосфатно-солевым буферном растворе и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

1.19. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой

микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

1.20. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 30 с регистрировали величину в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

1.21. По завершении выполнения п. 1.20. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому как это было описано в п. 1.19.

1.22. В течение 100 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

1.23. При помощи специального программного обеспечения вычисляли разность в милливольтх  $\delta$  между величинами фонового и конечного потенциала биосенсора.

1.24. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 1.19. - 1.23., используя приготовленные в ходе выполнения п. 1.10. образцы с известной концентрацией HBsAg.

1.25. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 1.24., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости "  $\delta$  - концентрация HBsAg в образце" (фиг. 10).

1.26. Использовали полученные в ходе выполнения пп. 1.1. - 1.18. биосенсоры и полученный в ходе выполнения п. 1.25. калибровочный график для определения концентрации HBsAg в образцах сывороток крови.

Пример N 2.

2.1. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.5.

2.2. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, для чего:

2,5 мл свежеперегнанного пиррола и 0,05 г SDS растворяли в 20,0 мл деионизованной воды;

полученный раствор в течение 5 минут обрабатывали ультразвуком;

2.3. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, для чего:

200 мкл раствора для электрохимической полимеризации помещали в лунку микротитрационного планшета;

в лунку погружали электрод, платиновую проволоку и полумикроэлектрод сравнения, подключенные к потенциостату;

циклично развевывали потенциал электрода относительно электрода сравнения в диапазоне +800 - +2200 мВ и скоростью развертки 100 мВ/с;

процесс образования пленки полипиррола контролировали по виду вольтамперной кривой при помощи X-Y самописца, подключенного к соответствующим выходам потенциостата, и по суммарному количеству прошедшего через электрод электричества при помощи интегратора и самописца, подключенных к соответствующим выходам потенциостата;

по достижении заданной толщины пленки

полипиррола (количество циклов развертки потенциала - 8, суммарное количество прошедшего через электрод электричества ~750 мк) процесс останавливали.

2.4. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирку с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

2.5. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 2.3. - 2.4., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

2.6. Готовили раствор стрептавидина, для чего "Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды и в полученном растворе растворяли 1,0 мг стрептавидина.

2.7. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности покрывающей биосенсор пленки полипиррола, для чего:

раствор стрептавидина разливали в микропробирки по 200 мкл;

биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором стрептавидина и инкубировали в них в течение 18 часов при температуре +4°C;

биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором стрептавидина, промывали 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором и каждый помещали в раствор для хранения, где хранили при температуре +4°C.

2.8. Готовили серию образцов с известной концентрацией HBsAg, аналогично тому, как это было описано в п. 1.10.

2.9. К 19,9 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,1 мл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

2.10. К 19,9 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,1 мл раствора меченых бараньих моноклональных антител к мышинным IgG, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

2.11. Готовили рабочий буферный раствор N 1, аналогично тому, как это было описано в п. 1.13.

2.12. Готовили рабочий буферный раствор N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 1.14.

2.13. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg и инкубировали в них в течение 10 минут.

2.14. По завершении выполнения п. 2.13. биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором биотинилированных антител и помещали в микропробирки с образцами с известной концентрацией HBsAg, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали 15 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

2.15. По завершении выполнения п. 2.14.

биосенсоры извлекали из микропробирок с образцами и помещали в микропробирки с раствором меченых бараньих моноклональных антител к мышинным IgG, далее устанавливали их на ротационный шейкер и выдерживали 5 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

2.16. По завершении выполнения п. 2.15. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали в течение 3 - 5 с в 0,01 М фосфатно-солевым буферном растворе и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

2.17. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

2.18. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 30 с регистрировали величину в милливольттах потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

2.19. По завершении выполнения п. 2.18. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 2.17.

2.20. В течение 100 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольттах потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

2.21. При помощи специального программного обеспечения вычисляли разность в милливольттах  $\delta$  между величинами фонового и конечного потенциала биосенсора.

2.22. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 2.17. - 2.21., используя приготовленные в ходе выполнения п. 2.8. образцы с известной концентрацией HBsAg.

2.23. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 2.22., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости "  $\delta$  - концентрация HBsAg в образце".

2.24. Готовили серию образцов сывороток крови, для чего HBsAg-положительную (содержащую HBsAg) сыворотку крови последовательно разводили предварительно размороженной бычьей сывороткой в 10, 100, 1000, 5000, 10000 раз. Каждый образец помещали в микропробирку.

2.25. Использовали полученные в ходе выполнения пп. 2.1. - 2.16. биосенсоры для определения нижнего порога абсолютной чувствительности биосенсорной системы (фиг. 11).

Пример N 3.

3.26. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.3.

3.27. Осуществляли биотинилирование бычьего сывороточного альбумина, аналогично тому, как это было описано в п. 1.4. Полученный раствор биотинилированного бычьего сывороточного альбумина разливали

на аликвоты малого объема (~10 мкл) и хранили при температуре +4°C.

3.28. Осуществляли конъюгирование кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину с латесными микросферами, аналогично тому, как это было описано в п. 1.5. Полученный раствор меченых антител разливали на аликвоты малого объема (~5 мкл) и хранили при температуре +4°C.

3.29. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.2.

3.30. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.3.

3.31. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (pH 7,4) и помещали в микропробирку с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

3.32. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 3.5. - 3.6., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

3.33. Готовили раствор стрептавидина, аналогично тому, как это было описано в п. 2.6.

3.34. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности пленки, покрывающей биосенсор пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.7.

3.35. Готовили серию образцов с известной концентрацией немеченых кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину, для чего:

исходный образец кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину диализовали при температуре +4°C в течение ночи против 500-кратного объема 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора;

полученный раствор кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину в 0,01 М фосфатно-солевым буферном растворе последовательно разводили 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором в 10, 20, 50, 100, 1000, 5000 раз;

полученные образцы помещали в микропробирки.

3.36. К 19,2 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,8 мл раствора биотинилированного бычьего сывороточного альбумина, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

3.37. К 19,9 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,1 мл раствора меченых кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

3.38. Готовили рабочий буферный раствор N 1, для чего:

"Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды;

в полученном растворе растворяли 0,37 г хлорида калия.

3.39. Готовили рабочий буферный раствор N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 1.14.

3.40. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором биотинилированного бычьего сывороточного альбумина и инкубировали в них в течение 25 минут.

3.41. По завершении выполнения п. 3.15. биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором биотинилированного бычьего сывороточного альбумина и помещали в микропробирки с образцами с известной концентрацией немеченых кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали 25 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

3.42. По завершении выполнения п. 3.16. биосенсоры извлекали из микропробирок с образцами и помещали в микропробирку с раствором меченых кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину, далее устанавливали их на ротационный шейкер и выдерживали 10 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

3.43. По завершении выполнения п. 3.17. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали в течение 3 - 5 с в 0,01 М фосфатно-солевым буферном растворе и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

3.44. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

3.45. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 100 с регистрировали величину в милливольтках потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

3.46. По завершении выполнения п. 3.20. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 3.19.

3.47. В течение 200 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольтках потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

3.48. При помощи специального программного обеспечения вычисляли площадь (интеграл), ограниченную кривой изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения  $S_2$ .

3.49. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 3.19. - 3.23., используя приготовленные в ходе выполнения п. 3.10. образцы с известной концентрацией немеченых кроличьих поликлональных

антител к бычьему сывороточному альбумину.

3.50. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 3.24., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости "S<sub>2</sub> - концентрация немеченых кроличьих поликлональных антител к бычьему сывороточному альбумину в образце".

Пример N 4.

4.51. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.4.

4.52. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.2.

4.53. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.3.

4.54. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирки с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

4.55. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 4.3. - 4.4., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

4.56. Готовили раствор стрептавидина, аналогично тому, как это было описано в п. 2.6.

4.57. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности пленки, покрывающей биосенсор пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.7.

4.58. Готовили серию образцов с известной концентрацией HBsAg, аналогично тому, как это было описано в п. 1.10.

4.59. К 19,8 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,2 мл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

4.60. К 15 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 5 мл предварительно размороженной бычьей сыворотки и к 19,6 мл полученного раствора добавляли 0,4 мл раствора конъюгата мышинных моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

4.61. Готовили рабочий буферный раствор N 1, для чего "Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды.

4.62. Готовили рабочий буферный раствор N 2, для чего

растворяли "o-Phenylendiamine dihydrochloride tablet" и "Urea hydrogen peroxide/buffer tablet" в 20 мл деионизованной воды;

0,1 мл полученного раствора добавляли к 19,9 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере, помещали в емкость из непрозрачного стекла, где хранили до начала анализа при температуре +4°C.

4.63. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее

стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg и инкубировали в них в течение 5 минут.

5 4.64. По завершении выполнения п. 4.13. биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором биотинилированных антител и помещали в микропробирки с образцами с известной концентрацией HBsAg, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали 10 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

10 4.65. По завершении выполнения п. 4.14. биосенсоры извлекали из микропробирок с образцами и помещали в микропробирки с раствором конъюгата мышинных моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой, далее устанавливали их на ротационный шейкер и выдерживали 5 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

15 4.66. По завершении выполнения п. 4.15. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали в течение 3 - 5 с в 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

20 4.67. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

25 4.68. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 50 с регистрировали величину в милливольттах потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

30 4.69. По завершении выполнения п. 4.18. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 4.17.

35 4.70. В течение 100 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольттах потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

40 4.71. При помощи специального программного обеспечения вычисляли разность в милливольттах  $\delta$  между величинами фонового и конечного потенциала биосенсора.

45 4.72. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 4.17. - 4.21., используя приготовленные в ходе выполнения п. 4.8. образцы с известной концентрацией HBsAg.

50 4.73. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 4.22., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости "  $\delta$  - концентрация HBsAg в образце".

55 4.74. Готовили серию образцов сывороток крови, аналогично тому, как это было описано в п. 2.24.

4.75. Использовали полученные в ходе

выполнения пп. 4.1. - 4.16. биосенсоры для определения нижнего порога абсолютной чувствительности биосенсорной системы.

Пример N 5.

5.1. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.4.

5.2. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.2.

5.3. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.3.

5.4. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирку с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

5.5. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 5.3. - 5.4., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

5.6. Готовили раствор стрептавидина, аналогично тому, как это было описано в п. 2.6.

5.7. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности пленки, покрывающей биосенсор пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.7.

5.8. Готовили серию образцов с известной концентрацией HBsAg, аналогично тому, как это было описано в п. 1.10.

5.9. К 19,5 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,5 мл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

5.10. К 18,3 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 1,7 мл раствора конъюгата мышинных моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200  $\mu$ l.

5.11. Готовили рабочий буферный раствор N 1, аналогично тому, как это было описано в п. 4.11.

5.12. Готовили рабочий буферный раствор N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 4.12.

5.13. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg и инкубировали в них в течение 5 минут.

5.14. Одновременно с выполнением п. 5.13. в каждый образец с известной концентрацией HBsAg добавляли, предварительно отобрав из образца 10 мкл, 10 мкл раствора конъюгата мышинных моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой, микропробирку с образцами помещали в термомиксер.

5.15. По завершении выполнения пп. 5.13. - 5.14. биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором биотинилированных антител и помещали в установленные в термомиксер микропробирки

с образцами с известной концентрацией HBsAg и выдерживали в течение 15 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

5.16. По завершении выполнения п. 5.15. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали в течение 3 - 5 с в 0,01 М фосфатно-солевым буферным растворе и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

5.17. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

5.18. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 50 с регистрировали величину в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

5.19. По завершении выполнения п. 5.18. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому как это было описано в п. 5.17.

5.20. В течение 200 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

5.21. При помощи специального программного обеспечения вычисляли площадь (интеграл), ограниченную кривой изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения  $S_2$ .

5.22. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 5.17. - 5.21., используя приготовленные в ходе выполнения п. 5.8. образцы с известной концентрацией HBsAg.

5.23. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 5.22., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости " $S_2$  - концентрация HBsAg в образце".

5.24. Готовили серию образцов сывороток крови, аналогично тому, как это было описано в п. 2.24.

5.25. Использовали полученные в ходе выполнения пп. 5.1. - 5.7. биосенсоры для определения нижнего порога абсолютной чувствительности биосенсорной системы.

Пример N 6.

6.1. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.4.

6.2. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.2.

6.3. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.3.

6.4. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным

раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирки с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

6.5. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 6.3. - 6.4., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

6.6. Готовили раствор стрептавидина, аналогично тому, как это было описано в п. 2.6.

6.7. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности пленки, покрывающей биосенсор пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.7.

6.8. Готовили серию образцов с известной концентрацией HBsAg, аналогично тому, как это было описано в п. 1.10.

6.9. К 17,5 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 2,5 мл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

6.10. К 18,3 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 1,7 мл раствора конъюгата мышинных моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

6.11. Готовили рабочий буферный раствор N 1, аналогично тому, как это было описано в п. 4.11.

6.12. Готовили рабочий буферный раствор N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 4.12.

6.13. В каждый образец с известной концентрацией HBsAg добавляли, предварительно отобрав из образца 20 мкл, 10 мкл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к HBsAg и 10 мкл конъюгата мышинных моноклональных антител к HBsAg с пероксидазой, микропробирки с образцами помещали в термомиксер, где инкубировали в течение 10 минут при температуре 36°C и постоянном перемешивании.

6.14. По завершении выполнения п. 6.13. биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в установленную в термомиксер микропробирку с образцом с известной концентрацией HBsAg и выдерживали в течение 5 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

6.15. По завершении выполнения п. 6.14. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали течение 3 - 5 с в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

6.16. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были

погружены в раствор.

6.17. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 100 с регистрировали величину в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

6.18. По завершении выполнения п. 6.17. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 6.16. 6.19.

В течение 200 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

6.20. При помощи специального программного обеспечения вычисляли площадь (интеграл) 32, ограниченную кривой изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

6.21. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 6.16. - 6.20., используя приготовленные в ходе выполнения п. 6.8. образцы с известной концентрацией HBsAg.

6.22. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 6.21., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости "S<sub>2</sub> - концентрация HBsAg в образце".

6.23. Готовили серию образцов сывороток крови, аналогично тому, как это было описано в п. 2.24.

6.24. Использовали полученные в ходе выполнения пп. 6.1. - 6.7. биосенсоры для определения нижнего порога абсолютной чувствительности биосенсорной системы.

Пример N 7.

7.1. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.3.

7.2. Осуществляли биотинилирование мышинных моноклональных антител к инсулину, аналогично тому, как это было описано в п. 1.4. Полученный раствор биотинилированных мышинных моноклональных антител к инсулину разливали на аликвоты малого объема (~10 мкл) и хранили при температуре +4°C.

7.3. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.2.

7.4. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.3.

7.5. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирку с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

7.6. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 7.4. - 7.5., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

7.7. Готовили раствор стрептавидина, аналогично тому, как это было описано в п. 2.6.

7.8. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности пленки, покрывающей биосенсор пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.7.

7.9. Готовили серию образцов с известной концентрацией инсулина, для чего

1,12 г хлорида калия и 1,00 г бычьего сывороточного альбумина растворяли в 100 мл деионизованной воды;

в 200 мкл полученного раствора растворяли 100 мг лиофилизированного инсулина;

полученный раствор инсулина последовательно разводили деионизованной водой с хлоридом калия и бычьим сывороточным альбумином в 10, 20, 50, 100, 1000, 5000 и 10000 раз;

полученные образцы помещали в микропробирки.

7.10. К 19,2 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,8 мл раствора биотинилированных мышинных моноклональных антител к инсулину, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

7.11. К 19,98 мл 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора добавляли 0,02 мл исходного раствора конъюгата козьих моноклональных антител к мышинным IgG с уреазой, смесь тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

7.12. Готовили рабочий буферный раствор N 1, растворяя 2,24 г хлорида калия в 200 мл деионизованной воды.

7.13. Готовили рабочий буферный раствор N 2, растворяя 0,012 г мочевины в 20 мл рабочего буферного раствора N 1.

7.14. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее стрептавидином, извлекали из раствора для хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором биотинилированных мышинных моноклональных антител к инсулину и инкубировали в них в течение 10 минут.

7.15. По завершении выполнения п. 7.14. биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором биотинилированных антител и помещали в микропробирки с образцами с известной концентрацией инсулина, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали 15 минут при температуре +36°C и постоянном перемешивании.

7.16. По завершении выполнения п. 7.15. биосенсоры извлекали из микропробирок с образцами и помещали в микропробирки с раствором конъюгата козьих моноклональных антител к мышинным IgG с уреазой, далее устанавливали их на ротационный шейкер и выдерживали 10 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

7.17. По завершении выполнения п. 7.16. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали в течение 3 - 5 с в деионизованной воде с хлоридом калия и бычьим сывороточным альбумином и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

7.18. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в

IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

7.19. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 200 с регистрировали величину в милливольтках потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

7.20. По завершении выполнения п. 7.19. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 7.18.

7.21. В течение 400 с регистрировали при помощи специального программного обеспечения изменение величины в милливольтках потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

7.22. При помощи специального программного обеспечения вычисляли площадь (интеграл), ограниченную кривой изменения величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения  $S_2$ .

7.23. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 7.18. - 7.22., используя приготовленные в ходе выполнения п. 7.9. образцы с известной концентрацией инсулина.

7.24. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 7.23., при помощи специального программного обеспечения строили калибровочный график зависимости  $S_2$  - концентрация инсулина в образце".

Пример N 8.

8.1. Выполняли процедуры, описанные в пп. 1.1. - 1.3.

8.2. Готовили раствор для электрохимической полимеризации полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.2.

8.3. Проводили электрохимический синтез пленки полипиррола, аналогично тому, как это было описано в п. 2.3.

8.4. Биосенсор, покрытый пленкой полипиррола, извлекали из лунки, последовательно промывали деионизованной водой и 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) и помещали в микропробирки с 300 мкл раствора для хранения, где хранили при температуре +4°C.

8.5. Для получения необходимого количества биосенсоров повторяли процедуры, описанные в пп. 8.3. - 8.4., при этом в одной лунке проводили максимально 3 электрохимических синтеза полипиррола.

8.6. Готовили раствор стрептавидина, для чего "Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды и в полученном растворе растворяли 5,0 мг стрептавидина.

8.7. Осуществляли иммобилизацию стрептавидина на поверхности пленки, покрывающей биосенсор пленки полипиррола, для чего

раствор стрептавидина разливали в микропробирки по 300 мкл;

биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола, извлекали из раствора для

хранения, помещали каждый в микропробирку с раствором стрептавидина и инкубировали в них в течение 24 часов при температуре +4 °С;

биосенсоры извлекали из микропробирок с раствором стрептавидина, промывали 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором и дважды деионизованной водой, содержащей 0,01% азида натрия и 0,15 М хлорида калия, далее каждый биосенсор помещали в раствор для хранения, где хранили при температуре +4 °С.

8.8. Готовили раствор биотинилированного однокитевого ДНК-зонда, для чего

в 1 мл деионизованной воды растворяли 1 мг лиофилизованного препарата биотинилированного двукитевого ДНК-зонда, полученный раствор помещали в микропробирку;

микропробирку с раствором ДНК-зонда устанавливали на водяную баню, где инкубировали в течение 8 минут при температуре +100 °С;

микропробирку с раствором ДНК-зонда переносили в емкость с сухим льдом, где быстро охлаждали до 0 °С;

далее микропробирку с раствором ДНК-зонда переносили в морозильную камеру, где хранили в замороженном виде при температуре -20 °С.

8.9. Готовили раствор однокитевой ДНК комплементарной к биотинилированному ДНК-зонду, для чего

в 1 мл деионизованной воды растворяли 10 мг лиофилизованного препарата двукитевой ДНК комплементарной к биотинилированному ДНК-зонду, полученный раствор помещали в микропробирку;

микропробирку с раствором ДНК устанавливали на водяную баню, где инкубировали в течение 5 минут при температуре +100 °С;

микропробирку с раствором ДНК переносили в емкость с сухим льдом, где быстро охлаждали до 0 °С;

далее микропробирку с раствором ДНК переносили в морозильную камеру, где хранили в замороженном виде при температуре -20 °С.

8.10. Готовили раствор однокитевой ДНК некомплементарной к биотинилированному ДНК-зонду, аналогично тому, как это было описано в п. 8.9.

8.11. Готовили рабочий буферный раствор N 1, для чего

"Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды;

в полученном растворе растворяли 2 г бычьего сывороточного альбумина, 0,37 г хлорида калия и 0,12 г цитрата натрия.

8.12. Готовили рабочий буферный раствор N 2, для чего

"Phosphate buffered saline tablet" растворяли в 200 мл деионизованной воды;

в полученном растворе растворяли 2 г бычьего сывороточного альбумина и 1 г декстрансульфата натрия.

8.13. Биосенсоры, покрытые пленкой полипиррола с иммобилизованным на нее стрептавидином, извлекали из деионизованной воды, содержащей 0,01% азида натрия и 0,15 М хлорида калия, и на рабочую поверхность каждого биосенсора наносили 20 мкл предварительно размороженного и нагретого до комнатной

температуры раствора однокитевого ДНК-зонда.

8.14. По завершении выполнения п. 8.13. биосенсоры помещали во влажную камеру, где инкубировали в течение 60 минут при температуре +4 °С.

8.15. По завершении выполнения п. 8.14. биосенсоры извлекали из влажной камеры и каждый помещали в микропробирку с 200 мкл исходного буферного раствора для гибридизации ДНК, где хранили в течение непродолжительного времени при температуре +4 °С.

8.16. Готовили образцы, содержащие однокитевую ДНК, комплементарную к биотинилированному ДНК-зонду, для чего:

в 10 мл исходного буферного раствора для гибридизации ДНК растворяли 10 мг препарата лиофилизованной ДНК из спермы лосося;

к 0,99 мл полученного раствора добавляли 10 мкл предварительно размороженного и нагретого до комнатной температуры раствора однокитевой ДНК, комплементарной к биотинилированному ДНК-зонду;

полученный раствор тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

8.17. Готовили образцы, содержащие однокитевую ДНК, некомплементарную к биотинилированному ДНК-зонду, для чего

в 10 мл исходного буферного раствора для гибридизации ДНК растворяли 10 мг препарата лиофилизованной ДНК из спермы лосося;

к 0,9 мл полученного раствора добавляли 100 мкл предварительно размороженного и нагретого до комнатной температуры раствора однокитевой ДНК, некомплементарной к биотинилированному ДНК-зонду;

полученный раствор тщательно перемешивали на ротационном шейкере и разливали в микропробирки по 200 мкл.

8.18. Половину биосенсоров с иммобилизованным биотинилированным однокитевым ДНК-зондом извлекали из микропробирок с исходным буферным раствором для гибридизации ДНК и помещали в микропробирки с образцами, содержащими ДНК, комплементарную к биотинилированному ДНК-зонду, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали в течение 120 минут при температуре +42 °С и постоянном перемешивании.

8.19. По завершении выполнения п. 8.18. биосенсоры извлекали из микропробирок, ополаскивали в течение 3 - 5 с в рабочем буферном растворе N 1 и каждый помещали в лунку микротитрационного планшета, заполненную рабочим буферным раствором N 1.

8.20. Биосенсор и электрод сравнения устанавливали в электрические контакты держателя, подключенного к установленному в IBM PC измерительному устройству, и устанавливали держатель над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 1, так, чтобы биосенсор и электрод сравнения были погружены в раствор.

8.21. Запускали специальное программное обеспечение и с его помощью в течение 200 с регистрировали величину в милливольттах потенциала биосенсора относительно



потенциала электрода сравнения.

8.22. По завершении выполнения п. 8.21. держатель устанавливали над лункой микротитрационного планшета, заполненной рабочим буферным раствором N 2, аналогично тому, как это было описано в п. 8.20.

8.23. В течение 600 сек изменение величины в милливольтх потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

8.24. При помощи специального программного обеспечения вычисляли разность в милливольтх между величинами фонового и конечного потенциалов биосенсора.

8.25. Последовательно выполняли операции, описанные в пп. 8.20. - 8.24., используя приготовленные в ходе выполнения п. 4.8. образцы, содержащие ДНК комплементарную к биотинилированному ДНК-зонду.

8.26. Оставшуюся половину биосенсоров с иммобилизованным биотинилированным одонитевым ДНК-зондом извлекали из микропробирок с исходным буферным раствором для гибридизации ДНК и помещали в микропробирки с образцами, содержащими ДНК, некомплементарную к ДНК-зонду, далее устанавливали микропробирки с биосенсорами в термомиксер и выдерживали в течение 120 минут при температуре +42°C и постоянном перемешивании.

8.27. Выполняли процедуры, описанные в пп. 8.19. - 8.25., используя при этом образцы, содержащие ДНК, некомплементарную к биотинилированному ДНК-зонду.

8.28. На основании результатов, полученных в ходе выполнения п. 8.19 - 8.26., при помощи специального программного обеспечения строили кривые статистического распределения величин  $\delta$ , полученных при использовании образцов, содержащих ДНК, комплементарную и некомплементарную к биотинилированному ДНК-зонду.

Источники информации

1. Каспаров С.В., Фармаковский Д.А., Харламов А.А., Дамирян А.У., Ремень В.В., Устройство для определения биологически активных соединений в биологических жидкостях и способ изготовления чувствительного элемента.// Патент Российской Федерации N 2032908.

2. Kasparov S. V., Farmakovski D.A., Electrochemical Immunoassay.// WO 96/02001.

3. Фармаковский Д. А. , Милановский Е.Ю., Черкасов В.Р., Бирюков Ю.С., Комаров Б. В. , Способ электрохимической индикации иммунохимически активных макромолекул в исследуемых растворах. // Патент Российской Федерации N 2107296.

4. Ge Hailin, Wallace G.G., Ion Exchange properties of polypyrrole.// Reactive Polymers, 18, 133-140, 1992.

5. Curtin L.S., Komplin G.C., Pietro W.J., Diffusive Anion Exchange in polypyrrole films.// J. of Physical Chemistry, 92, 12-13, 1988.

6. Bobacka J., Gao Zh., Ivaska A., Lewenstam. A., Mechanism of ionic and redox sensitivity of p-type conducting polymers. Part 2. Experimental study of polypyrrole.// J. of Electroanalytical Chemistry, 368, 33-41, 1994.

7. Шеллер Ф., Пфайфер Д., Шуберт Ф., Реннеберг Р., Кирштайн Д., Применение ферментных амперометрических биосенсоров в анализе реальных объектов.// Биосенсоры: Основы и приложения. М.: Мир, 1992.

8. Taniguchi I., Yasukouchi K., Tsuji I., Potential-causing element for immunosensor.// EP 0193154 A2.

9. Hodgson A.J., Spencer M.J., Wallace G.G., Incorporation of proteins into conducting electroactive polymers. // Reactive Polymers, 18, 77-85, 1992.

10. John R. , Spencer M., Wallace G.G., Smyth M.R., Development of a polypyrrole-based human serum albumin sensor.// Analytica Chimica Acta, 249, 381-385, 1991.

11. Leary J. J. , Brigati D.J., Ward D.C., Rapid and sensitive colorimetric method for visualising biotin-labeled DNA probes hybridised to DNA or RNA immobilised on nitricellulose: bioblots.// Proc. Natl. Academy Science USA, 80, 4045-4049, 1983.

12. Rosenstein R. , Immuno-agglutination particle suspensions.// EP 0138297 A1.

13. Schasfoort R.B.M., Bergveld P., Bomer J., Kooyman R.P.H., Greve J., Modulation of the ISFET response by an immunological reaction.// Sensors and Actuators, 17, 531-535, 1989.

14. Schasfoort R.B.M., Keldermans C.E.J.M., Kooyman R.P.H., Bergveld P., Greve J. , Competitive immunological detection of progesterone by means of the ion-step induced response of an ImmunoFET.// Sensors and Actuators, B1, 368-372, 1990.

15. Schasfoort R. B. M. , Kooyman R.P.H., Bergveld P., Greve J., A New Approach to ImmunoFET Operation.// Biosensors and Bioelectronics, 5, 103-124, 1990.

16. Bergveld P. , A Critical evaluation of direct electrical protein detection methods.// Biosensors and Bioelectronics, 6, 55-72, 1991.

17. Hager H. J., Latex polymer reagents for diagnostic tests.// United States Patent 3,857,931.

18. Spadaro A.M., Engler Ph.V., Lyophilization of reagent-coated particles.// EP 0193208 B1.

19. Harlow E. , Lane D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

20. Rigby P.J.W., Dieckmann M., Rhodes C., Berg R., Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase.// J. of Molecular Biology, 113, 237-251, 1977.

**Формула изобретения:**

1. Способ количественного электрохимического анализа биомолекул, предусматривающий формирование биосенсора путем нанесения на поверхность потенциометрического электрода в ходе электрохимического синтеза из раствора мономера и фонового электролита пленки электропроводящего полимера, осуществление контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости, составление электрохимической измерительной ячейки из погруженных в рабочий раствор и связанных измерительным устройством биосенсора и электрода сравнения, регистрацию посредством измерительного устройства потенциала биосенсора относительно

электрода сравнения в рабочем растворе, регистрацию посредством измерительного устройства изменения потенциала биосенсора при скачкообразном изменении ионной силы рабочего раствора при постоянном значении величины его pH, расчет по величине изменения потенциала биосенсора количественного содержания анализируемого компонента в исследуемой жидкости, отличающийся тем, что электропроводящий полимер на стадии электрохимического синтеза допируют анионами, обладающими наибольшей способностью к ионному обмену с окружающим полимер раствором, иммобилизуют в или на пленку электропроводящего полимера авидин или стрептавидин, для иммобилизации на пленку электропроводящего полимера используют биотинилированные аффинные биорецепторы, с которыми осуществляют контакт биосенсора перед составлением электрохимической ячейки, перед измерением потенциала биосенсора в рабочем растворе осуществляют контакт биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами, а регистрацию изменения потенциала биосенсора осуществляют при изменении состава рабочего раствора.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве мономера при приготовлении раствора для электрохимического синтеза электропроводящего полимера используют пиррол, или тиофен, или фуран, или анилин.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве фоновго электролита при приготовлении раствора для электрохимического синтеза электропроводящего полимера используют додецилсульфат натрия.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве фоновго электролита при приготовлении раствора для электрохимического синтеза электропроводящего полимера используют декстрансульфат натрия.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что иммобилизацию авидина или стрептавидина в пленку электропроводящего полимера осуществляют на стадии его электрохимического синтеза.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что в качестве раствора для электрохимического синтеза электропроводящего полимера используют раствор мономера и фоновго электролита, дополнительно содержащий молекулы авидина или стрептавидина.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что иммобилизацию авидина или стрептавидина на пленку электропроводящего полимера осуществляют после его электрохимического синтеза.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что иммобилизацию авидина или стрептавидина на пленку электропроводящего полимера осуществляют путем приведения биосенсора покрытого пленкой электропроводящего полимера в контакт с раствором авидина или стрептавидина.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве биотинилированных аффинных биорецепторов используют моноклональные или поликлональные антитела или антигены или одонитевые молекулы ДНК.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что контакт биосенсора с раствором

биотинилированных аффинных биорецепторов осуществляют непосредственно перед контактом биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

5 11. Способ по п.1, отличающийся тем, что контакт биосенсора с раствором биотинилированных аффинных биорецепторов осуществляют в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

10 12. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют биорецепторы, специфичные в биотинилированным аффинным биорецепторам.

15 13. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют биорецепторы, специфичные к анализируемым биомолекулам.

20 14. Способ по п.12 или 13, отличающийся тем, что в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют биорецепторы, молекулы которых конъюгированы с зарядовой меткой.

25 15. Способ по п.14, отличающийся тем, что в качестве зарядовой метки используют латексные микросферы.

16. Способ по п.12 или 13, отличающийся тем, что в качестве дополнительных меченых биорецепторов используют биорецепторы, молекулы которых конъюгированы с ферментной меткой.

30 17. Способ по п.16, отличающийся тем, что в качестве ферментной метки используют пероксидазу или уреазу, или щелочную фосфатазу или глюкозооксидазу.

35 18. Способ по п.1, отличающийся тем, что контакт биосенсора с образцом исследуемой жидкости осуществляют непосредственно после контакта биосенсора с раствором биотинилированных биорецепторов.

40 19. Способ по п.1, отличающийся тем, что контакт биосенсора с образцом исследуемой жидкости осуществляют одновременно с контактом биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами.

45 20. Способ по п.1, отличающийся тем, что контакт биосенсора с образцом исследуемой жидкости осуществляют одновременно с контактом биосенсора с биотинилированными антителами и дополнительными мечеными биорецепторами.

21. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве исследуемых жидкостей используют цельную кровь, или сыворотку крови, или плазму, или мочу, или лимфу.

50 22. Способ по п.1, отличающийся тем, что контакт биосенсора с дополнительными мечеными биорецепторами осуществляют путем приведения биосенсора в контакт с раствором дополнительных меченых биорецепторов.

55 23. Способ по п.22, отличающийся тем, что контакт биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов осуществляют после контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

60 24. Способ по п.22, отличающийся тем, что контакт биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов осуществляют в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости.

25. Способ по п.22, отличающийся тем, что

контакт биосенсора с раствором дополнительных меченых биорецепторов осуществляют в процессе контакта биосенсора с образцом исследуемой жидкости и одновременно с биотинилированными аффинными биорецепторами.

26. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве рабочего раствора при составлении электрохимической измерительной ячейки используют водные буферные растворы - фосфатно-солевой или Tris-HCL, или карбонатно-бикарбонатный, или ацетатный, или боратный.

27. Способ по п.1, отличающийся тем, что при составлении электрохимической измерительной ячейки используют проточную ячейку малого объема, через которую прокачивают рабочий раствор.

28. Способ по п.1, отличающийся тем, что скачкообразно изменяют величину ионной силы рабочего раствора, повышая ее.

29. Способ по п.1, отличающийся тем, что скачкообразно изменяют величину ионной силы рабочего раствора, понижая ее.

30. Способ по п.28 или 29, отличающийся тем, что переносят биосенсор и электрод сравнения из исходного рабочего раствора в рабочий раствор того же состава, но с контрастной ионной силой.

31. Способ по п.28 или 29, отличающийся тем, что вводят раствор с контрастной ионной силой в емкость с исходным рабочим раствором, в которой находятся биосенсор и электрод сравнения.

32. Способ по п.28 или 29, отличающийся тем, что вытесняют раствором с контрастной ионной силой исходный рабочий раствор из емкости, в которой находится биосенсор и электрод сравнения.

33. Способ по п.1, отличающийся тем, что изменяют состав рабочего раствора путем добавления в него соответствующего субстрата, реагирующего с ферментной меткой.

34. Способ по п.33, отличающийся тем, что переносят биосенсор и электрод сравнения из исходного рабочего раствора в рабочий раствор, содержащий субстрат, реагирующий с ферментной меткой.

35. Способ по п.33, отличающийся тем, что вводят раствор субстрата в емкость с исходным рабочим раствором, в которой находятся биосенсор и электрод сравнения.

36. Способ по п.33, отличающийся тем, что

вытесняют рабочим раствором, содержащим субстрат, исходный рабочий раствор из емкости, в которой находится биосенсор и электрод сравнения.

37. Способ по п.33, отличающийся тем, что в качестве субстрата используют OPD (0-Phenylenediamine) или ABTS ( $\{2,2'$ -Azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]  $\}$ ), или TMB (3,3', 5,5'-Tetraethylbenzidine), или DAB (3,3'-Diaminobenzidine), или мочевины, или BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate), или глюкозу.

38. Способ по п.1, отличающийся тем, что величину изменения потенциала биосенсора определяют путем вычисления разности в милливольтх между величинами его фонового и конечного напряжений.

39. Способ по п.1, отличающийся тем, что величину изменения потенциала биосенсора определяют путем вычисления площади (интеграла), ограниченной кривой изменения во времени величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения.

40. Способ по п.38 или 39, отличающийся тем, что для определения фонового значения потенциала биосенсора регистрируют величину его потенциала относительно потенциала электрода сравнения в исходном рабочем растворе.

41. Способ по п.40, отличающийся тем, что дрейф фонового потенциала биосенсора вычисляют путем линеаризации кривой "величина потенциала биосенсора - время регистрации" по методу наименьших квадратов.

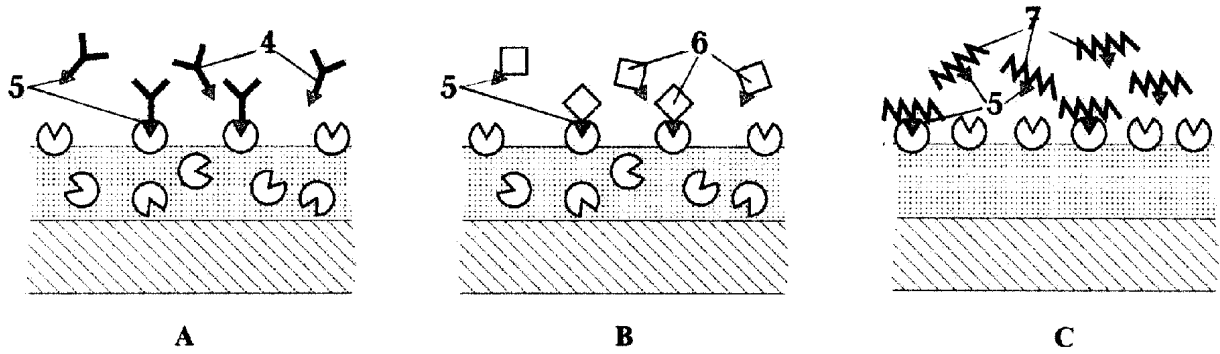
42. Способ по п.38, отличающийся тем, что определение конечного значения потенциала биосенсора осуществляют путем регистрации величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения при скачкообразном изменении ионной силы или состава рабочего раствора.

43. Способ по п.39, отличающийся тем, что определение площади (интеграла), ограниченной кривой изменения во времени величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения, осуществляют путем регистрации величины потенциала биосенсора относительно потенциала электрода сравнения при скачкообразном изменении ионной силы или состава рабочего раствора.

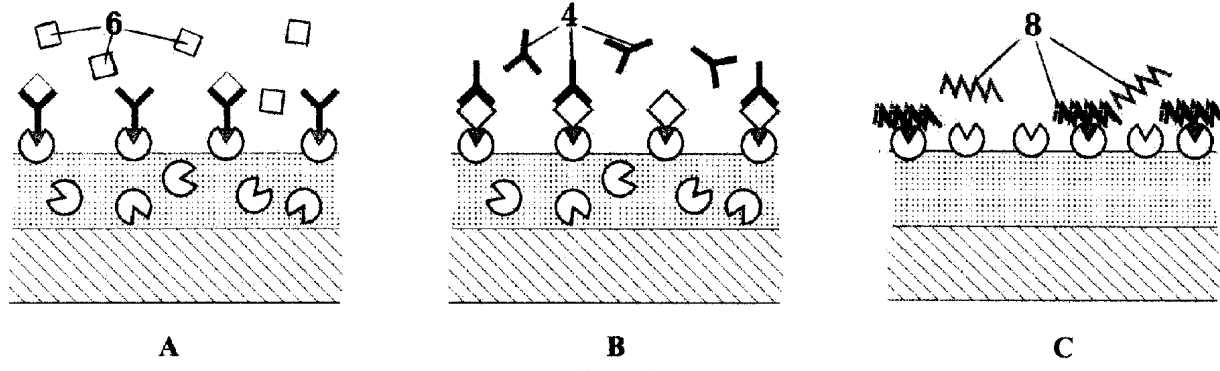
50

55

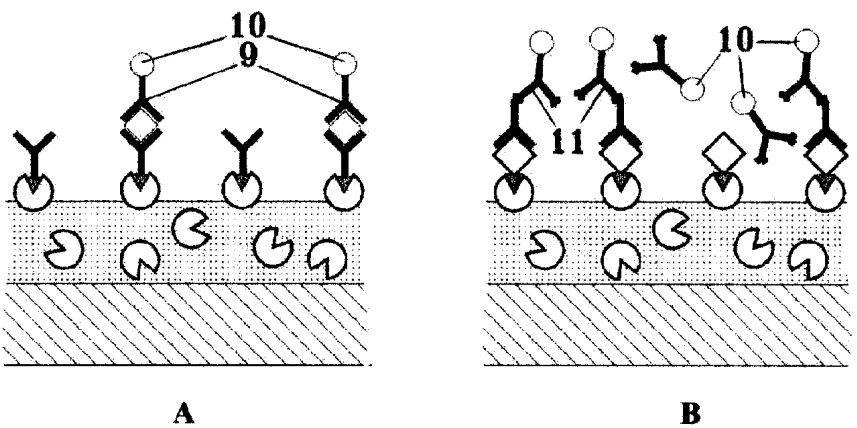
60



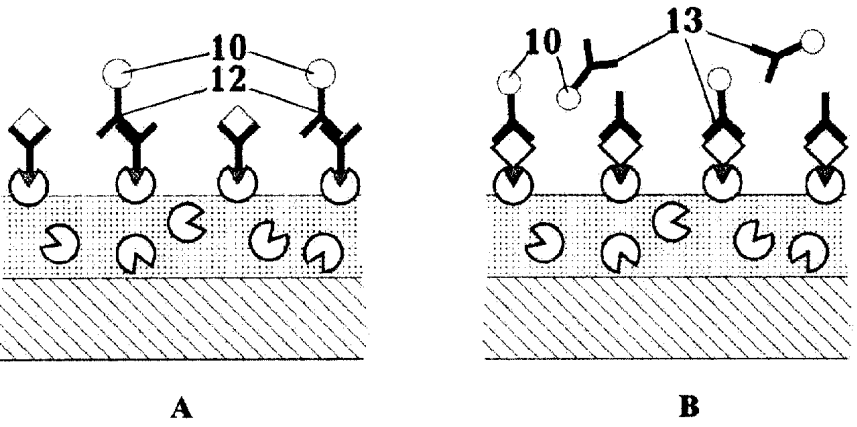
Фиг.2



Фиг.3



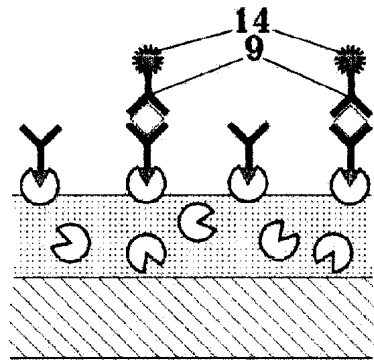
Фиг.4



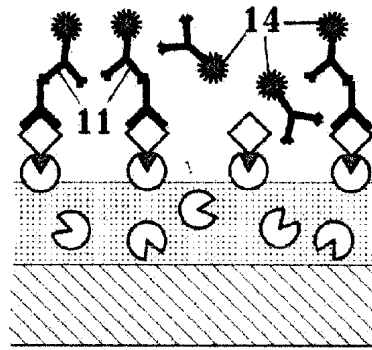
Фиг.5

RU 2161653 C2

RU 2161653 C2

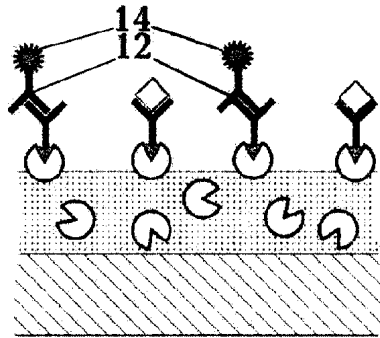


A

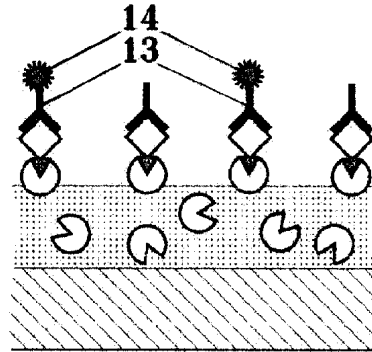


B

Фиг.6

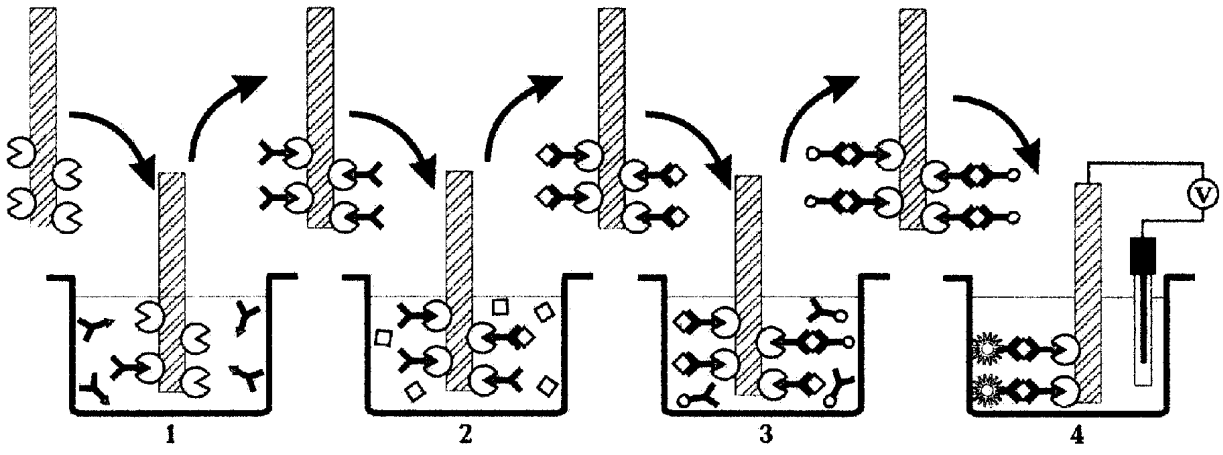


A

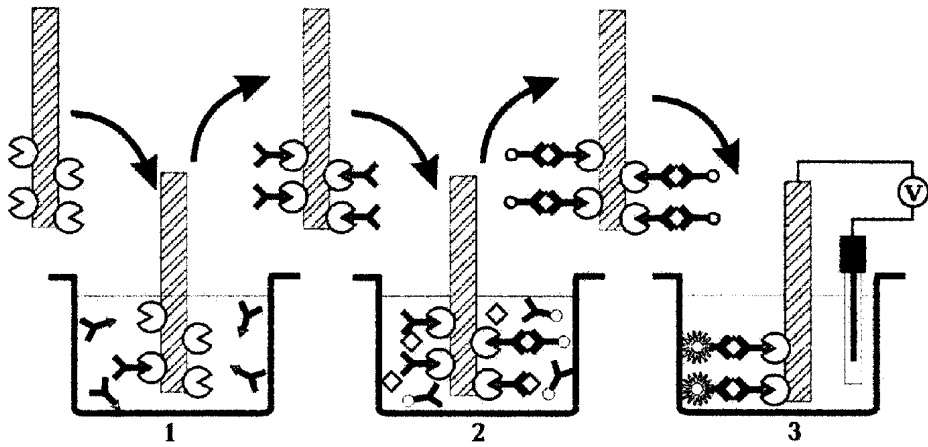


B

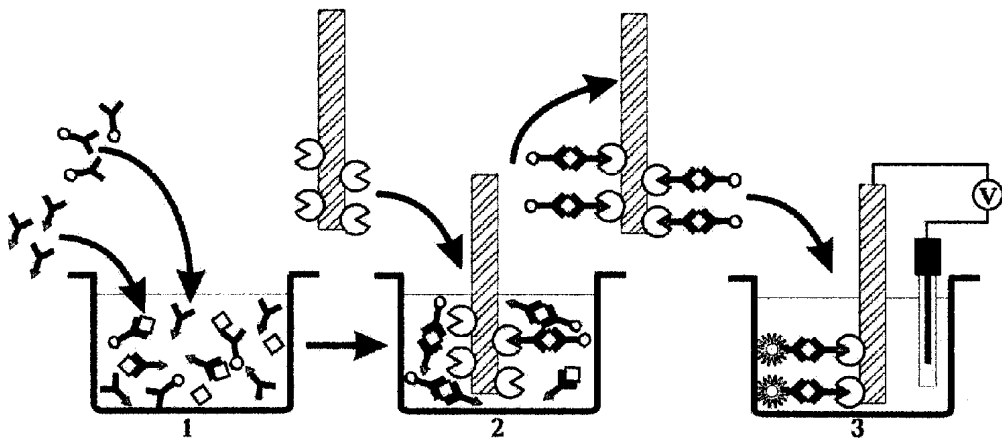
Фиг.7



A



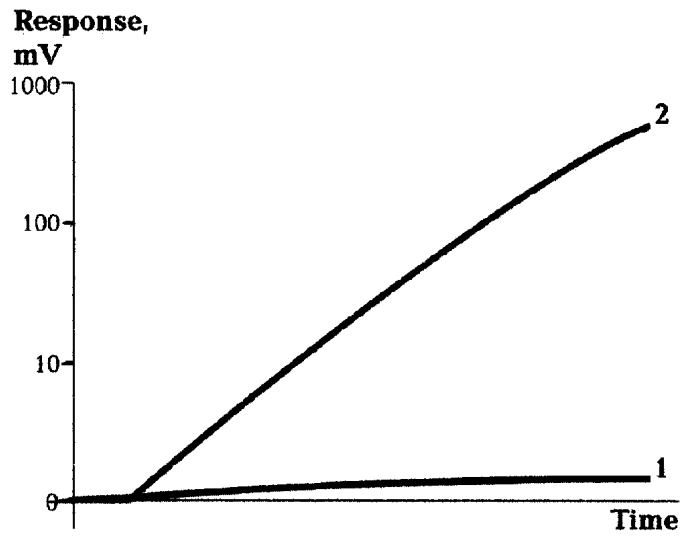
B



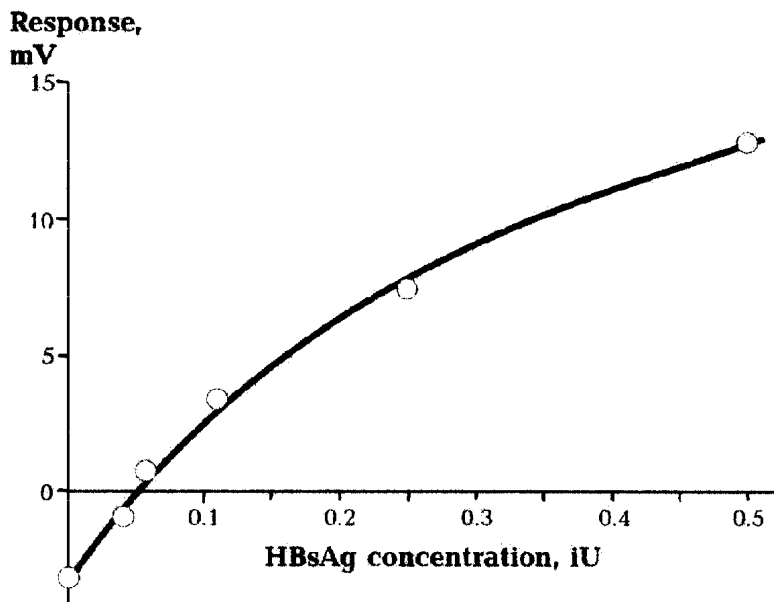
C

Фиг.8

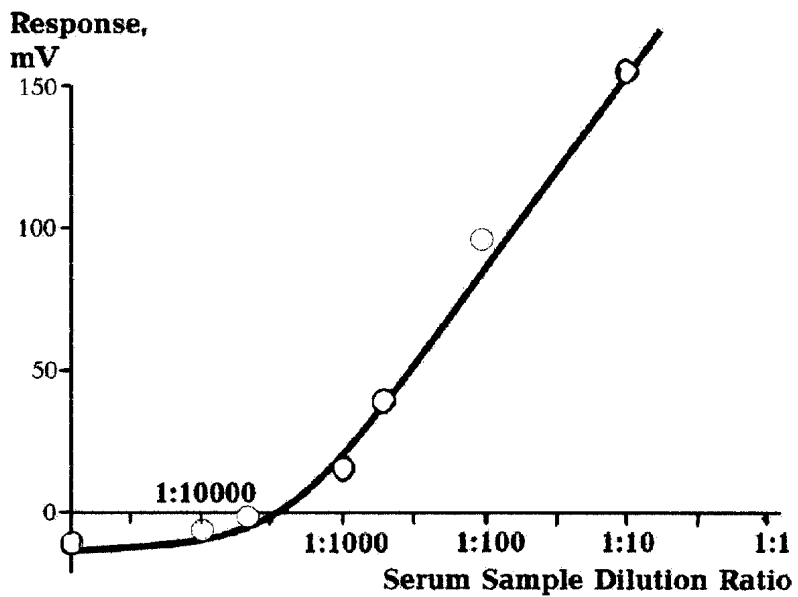
RU 2161653 C2



Фиг.9



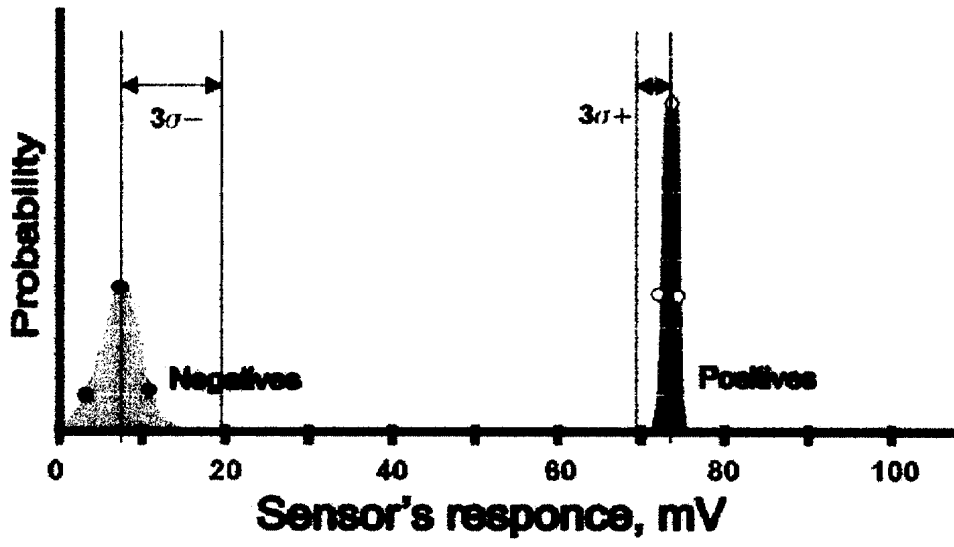
Фиг.10



Фиг.11

RU 2161653 C2

RU 2161653 C2



Фиг.12

RU 2161653 C2