

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ПОЛИОМИЕЛИТА

А.В. Бережнова<sup>1\*</sup>, Л.Е. Агафонова<sup>1</sup>, Ю.Ю. Ивин<sup>1,2</sup>, А.Н. Пиняева<sup>1,2</sup>, А.А. Ковпак<sup>2</sup>, И.В. Левин<sup>2</sup>, А.А. Ишмухаметов<sup>2</sup>,  
С.В. Будник<sup>3</sup>, Р.С. Чурюкин<sup>3</sup>, Д.Д. Жданов<sup>1</sup>, А.И. Арчаков<sup>1,4</sup>, В.В. Шумянцева<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*e-mail: alinalikeed@mail.ru

<sup>2</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), 108819, Москва, поселение Московский,  
посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1

<sup>3</sup>“Теокортекс”, 108808, Москва, поселение Первомайское, кв-л 328, 34, стр. 6

<sup>4</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,  
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

С целью получения псевдовirusных частиц, пригодных для производства вакцин, разработан электрохимический иммуносенсор для оценки сохранности D-антигена штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 и типа 1 после инактивации. Для иммобилизации моноклональных антител использовали наночастицы золота, получаемые электросинтезом на поверхности рабочего графитового электрода. При увеличении концентрации антигена регистрируется снижение интенсивности сигнала тока пика феррицианида калия, используемого в качестве редокс-зонда. Определены значения пределов обнаружения (LOD) для штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2, равные 9.4 DU/мл и 15 DU/мл соответственно (DU/мл – D-антигенные единицы на миллилитр, 1 DU = 15 нг). Рассчитаны константы связывания (Kb) процесса образования комплексов антитело-антиген,  $4.68 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  для Mab2-SII и  $1.07 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  для Mab1-SI. Высокоаффинное взаимодействие ( $Kb \sim 10^8 \text{ M}^{-1} - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) в системах антитело-антиген свидетельствует о сохранности структуры D-антигена после различных методов инактивации вируса полиомиелита.

**Ключевые слова:** электрохимический иммуносенсор; полиомиелит; инактивация; феррицианид калия; моноклональные антитела; золотые наночастицы.

DOI: 10.18097/BMCRM00339

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус полиомиелита (*Enterovirus coxsackievirus*) относится к числу наиболее глубоко изученных вирусов. Детальная характеристика его структуры, иммунологических свойств и механизмов взаимодействия с клеткой-хозяином делают его ключевой модельной системой для разработки вакцин нового поколения, таких как вакцины на основе инактивированных (псевдовirusных) и вирусоподобных частиц [1-3].

Существуют две антигенные формы полиовируса, называемые D- и С-антигенами. D-антиген представляет собой нативную форму частицы, вызывающую выработку нейтрализующих антител [4]. Антиген D может преобразовываться в форму С в результате нагревания, адсорбции на поверхности или мягкой обработки УФ-излучением [5]. С-антиген не вызывает образование нейтрализующих антител [6, 7]. Следовательно, сохранение структуры D-антигена является основной задачей при разработке методов инактивации вируса [6].

Для создания вакцин нового типа применяют псевдовirusные частицы на основе вирусов, инактивированных различными методами. Для получения

псевдовirusных частиц используют инактивацию нативного вириона вируса химическими реагентами, такими как β-пропиолактон, формальдегид [8-11], а также физическими методами воздействия, в частности, электронным облучением [12-14].

Определение содержания антигена и иммуногенной активности позволяют выработать оптимальную стратегию инактивации вирусов. С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR) оценивают сохранность структуры антигена [5, 6]. Методом SPR-анализа было исследовано взаимодействие антител со штаммами Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2, инактивированных химическими реагентами [15]. Метод SPR требует дорогостоящего оборудования, золотых сенсорных оптических чипов и дополнительных реагентов для ковалентной иммобилизации антител на их поверхности.

Электрохимические иммуносенсоры для диагностики вирусных заболеваний привлекают внимание благодаря возможности миниатюризации, экономичности, простоте эксплуатации, быстрому отклику, высокой чувствительности и специфичности анализа. Разработаны вольтамперометрические, амперометрические, импедиметрические и потенциометрические типы



**Таблица 1.** Концентрация общего белка и D-антигена в образцах штаммов Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (штамм LSc 2ab, далее SI) и типа 2 (штамм P712 Ch 2 ab, далее SII) после инактивации

| ОБРАЗЕЦ                 | ***Концентрация D-антигена, DU/мл | Концентрация D-антигена, пМ |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| SII БПЛ*                | 744                               | 1352.7                      |
| SII (2-8°C, 10×3 кГр)** | 15.2                              | 27.6                        |
| SII (-20°C, 10×3 кГр)** | 130.85                            | 237.9                       |
| SI (2-8°C, 8.3×3 кГр)** | 42.2                              | 76.7                        |

**Примечание:** \* – образцы вирусов, инаktivированные β-пропиолактоном (БПЛ), были очищены с помощью двух стадий (гель-фильтрация и ионообменная хроматография) и подготовлены в 40 мМ фосфатном буфере со 150 мМ NaCl; \*\* – образцы вирусов, инаktivированные облучением ускоренными электронами с дробным введением дозы 30кГр при 2-8°C и -20 °C, 25 кГр при 2-8°C; \*\*\* – концентрация D-антигена определена с помощью ИФА анализа; (DU/мл - D-антигенные единицы на миллилитр, 1 DU =15 нг).

электрохимических иммуносенсоров для обнаружения вируса гриппа, SARS-CoV-2, вируса Денге, вируса гепатита С и др. [16-24]. Электрохимические стратегии выявления вирусов на основе меток и медиаторов электронного переноса с использованием модификаций рабочих электродов для усиления сигнала позволяют достигать низких пределов обнаружения вирусов. Необходимо отметить, что в литературе не описан электрохимический иммуносенсорный анализ штаммов вируса полиомиелита.

Цель исследования – разработать электрохимический иммуносенсор для оценки сохранности D-антигена штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 и типа 1 после инаktivации β-пропиолактоном (БПЛ) и облучением ускоренными электронами. В связи с поставленной целью сформулированы следующие экспериментальные задачи:

- оптимизация метода иммобилизации антител как биорецепторов к вирусу полиомиелита на печатных графитовых электродах;
- анализ электрохимических методов регистрации взаимодействия антиген/антитело для оценки эффективности связывания;
- расчёт константы связывания (Kb) процесса образования комплекса антитело-антиген.

## МЕТОДИКА

### Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: тетрахлорзолотая кислота тригидрат (99.9%) (“Sigma-Aldrich”, США); однозамещенный фосфат калия, хлорид натрия, хлорид калия, феррицианид калия (“Реахим”, Россия); соляная кислота (“Сигма Тек”, Россия). Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду.

Образцы штаммов Сэбина полиовируса, подвергнутые инаktivации β-пропиолактоном и облучению ускоренными электронами при различных температурах пробоподготовки (табл. 1), были получены по ранее описанной методике [15, 25-26]. В работе использованы моноклональные антитела к штамму Сэбина полиовируса типа 1 (Mab1), моноклональные антитела к штамму Сэбина полиовируса типа 2 (Mab2) (Mab234 type 1 и Mab1050 type 2, “NIBSC”, Великобритания).

### Оборудование

В работе использовали трехконтактные электроды (ПГЭ), полученные методом трафаретной печати

(“КолорЭлектроникс”, Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами, хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 2 мм (площадь 0.0314 см<sup>2</sup>). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (отн. Ag/AgCl).

Электрохимические измерения проводили на потенциостате PalmSens (“PalmSens BV”, Нидерланды) с программным обеспечением PSTrace (версия 5.8) с использованием клетки Фарадея (“Metrohm Autolab”, Нидерланды) для экранирования рабочей ячейки от внешних электромагнитных полей.

Иммуноанализ проводили в аэробных условиях при комнатной температуре методом квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА) в диапазоне потенциалов от -0.2 до +0.5 В. Оптимизированными параметрами измерений для КВВА были следующие: шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ и частота 10 Гц, скорость сканирования 100 мВ/с.

### Модификация печатного графитового электрода золотыми наночастицами, получаемыми электросинтезом

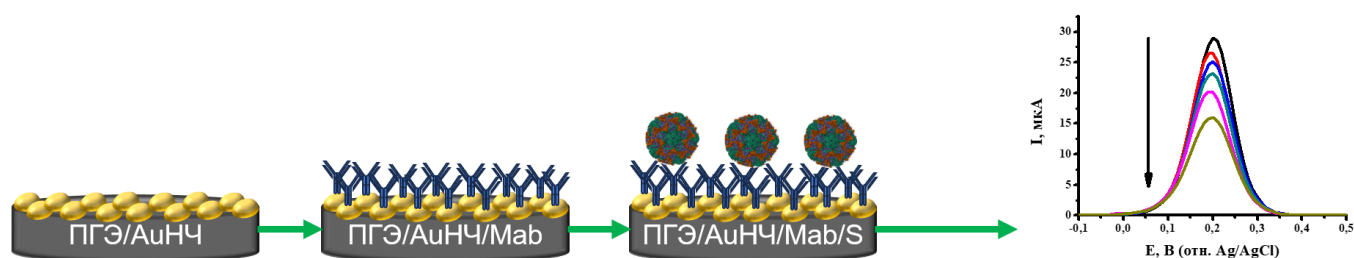
Навеску  $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  массой 0.003 г растворяли в 1500 мкл 0.1 М HCl. 60 мкл полученного 5 мМ раствора  $\text{HAuCl}_4/0.1 \text{ М HCl}$  наносили на поверхность ПГЭ и проводили электросинтез золотых наночастиц (AuНЧ) методом хроноамперометрии в течение 180 с при потенциале -0.5 В, в горизонтальном режиме. Затем поверхность ПГЭ промывали дистиллированной водой и высушивали в течение 15 мин при комнатной температуре.

### Иммобилизация антител к вирусу полиомиелита на модифицированном золотыми наночастицами электроде

На рабочую поверхность ПГЭ, модифицированного AuНЧ (ПГЭ/AuНЧ), наносили 2 мкл коммерческих образцов Mab в разведении 1:600 и иммобилизовали 24 ч при 4°C.

### Электрохимический метод регистрации взаимодействия антиген/антитело для оценки эффективности связывания

На рабочую поверхность электрода ПГЭ/AuНЧ/Mab наносили 2 мкл образца псевдовиральных частиц и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Перед измерением сигнала электрод отмывали в 1 мл 0.1 М калий фосфатного буфера (pH=7,4) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем электрод помещали в 1 мл 5 мМ раствор  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (0.067 г  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 3.725 г KCl и 0.0824 г  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  на 50 мл дистиллированной воды) и проводили измерение в вертикальном режиме методом КВВА.



**Рисунок 1.** Схема электрохимического иммуносенсорного анализа псевдовиральных частиц.

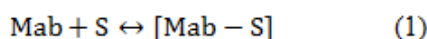
### Математическая обработка результатов

Для обработки значений интенсивности сигналов применяли программу PSTrace с коррекцией по базовой линии. Электрохимическим параметром служило численное значение максимальной амплитуды тока пика окисления (в микроамперах, мкА) при соответствующем потенциале (в Вольтах, В).

Графики строили в программе OriginPro 8. Массив полученных экспериментальных данных подвергали статистической обработке. Все приведённые электрохимические данные представляют результаты трёх параллельных экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение.

### Расчет константы связывания комплекса антитело-антиген

Константу связывания  $K_b$  для процесса образования комплекса [Mab-S] (1) рассчитывали по уравнению (2) при постоянной концентрации Mab в системе [27].



$$\log\left(\frac{1}{[D]}\right) = \log\left(\frac{I[\text{Mab-S}]}{I[\text{Mab}] - I[\text{Mab-S}]}\right) + \log K_b \quad (2),$$

где [D] – концентрация D-антигена, (M), S – псевдовиральные частицы штаммов Сэбина,  $K_b$  – константа связывания, ( $M^{-1}$ ),  $I[\text{Mab}]$  – максимальная амплитуда тока электроокисления  $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  на электроде с иммобилизованным Mab,  $I[\text{Mab-S}]$  – максимальная амплитуда тока электроокисления  $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  на электроде с комплексом [Mab-S].

### Расчет нижнего предела обнаружения

Расчет нижнего предела обнаружения (LOD) проводили по уравнению (3):

$$\text{LOD} = \frac{3sd}{a} \quad (3),$$

где  $sd$  – стандартное отклонение аналитического сигнала фона,  $a$  – тангенс угла наклона градуировочной функции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным этапом при разработке иммуносенсоров является иммобилизация антител на сенсорном элементе. Разработаны различные методы и подходы для фиксации

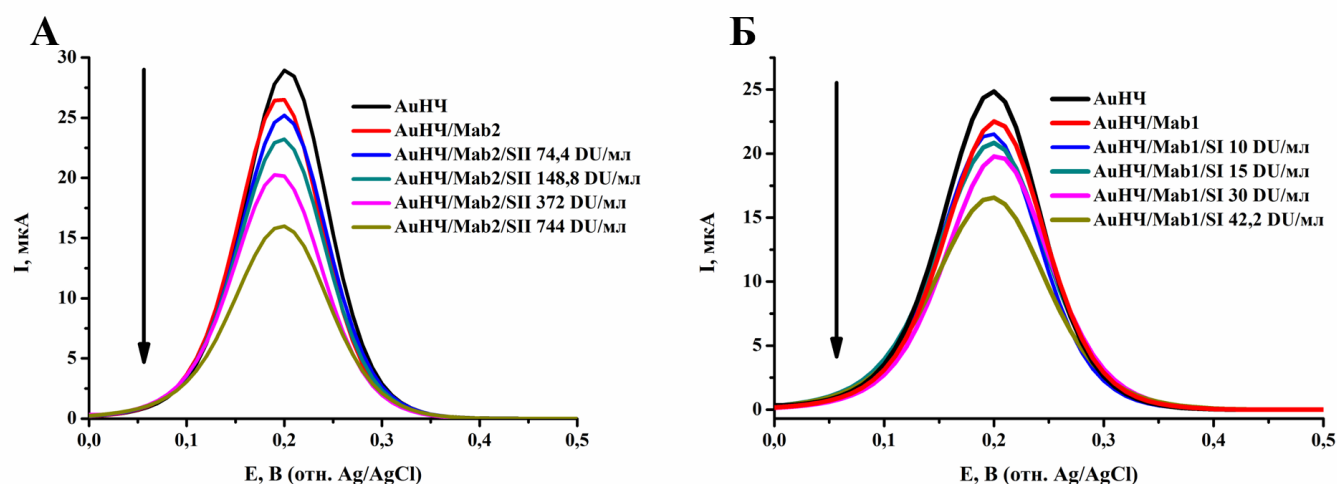
антител на поверхности сенсорного элемента [28-33]. В SPR-анализе белок А был использован для ориентированной иммобилизации антител за Fc-фрагмент на сенсорных чипах [15]. С помощью SPR-биосенсора определены кинетические и равновесные параметры аффинных взаимодействий штаммов Сэбина вируса полиомиелита. Высокоаффинное взаимодействие инактивированных вакцинных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 с иммобилизованными антителами свидетельствует о сохранности структуры D-антигена после инактивации ( $K_b = 1.30 \times 10^9 M^{-1} - 9.61 \times 10^{10} M^{-1}$ ). Для проведения электрохимического иммуносенсорного анализа полиовирусных частиц был разработан метод ковалентной иммобилизации антител к вирусу полиомиелита на поверхности ПГЭ, модифицированного золотыми наночастицами (AuНЧ). Модификация электрода наночастицами золота служит как для иммобилизации антител, так и для усиления регистрируемых сигналов электрода за счет улучшения электротранспортных свойств системы [33-35]. Золотые наночастицы были получены методом электросинтеза на рабочей поверхности печатного графитового электрода (ПГЭ/AuНЧ). Размер наночастиц был определен с помощью сканирующего электронного микроскопа и составил 100-700 нм [36, 37]. AuНЧ образуют стабильную ковалентную связь с меркаптогруппой цистеина антител [38]. Схема иммуносенсорного анализа приведена на рисунке 1. Связывание антител с золотыми наночастицами на поверхности электрода (ПГЭ/AuНЧ) регистрировали методом КВВА в растворе 5 мМ феррицианида калия как индикаторного внешнего электролита (рис. 2 А,Б). При иммобилизации антител наблюдалось снижение тока пика феррицианида калия по сравнению с ПГЭ/AuНЧ без антител.

Образование комплекса антиген-антитело регистрировали по снижению интенсивности тока пика электроокисления феррицианида калия с увеличением концентрации антигена, так как комплекс антиген-антитело на поверхности электрода действует как барьер для электронного переноса [24, 39-40].

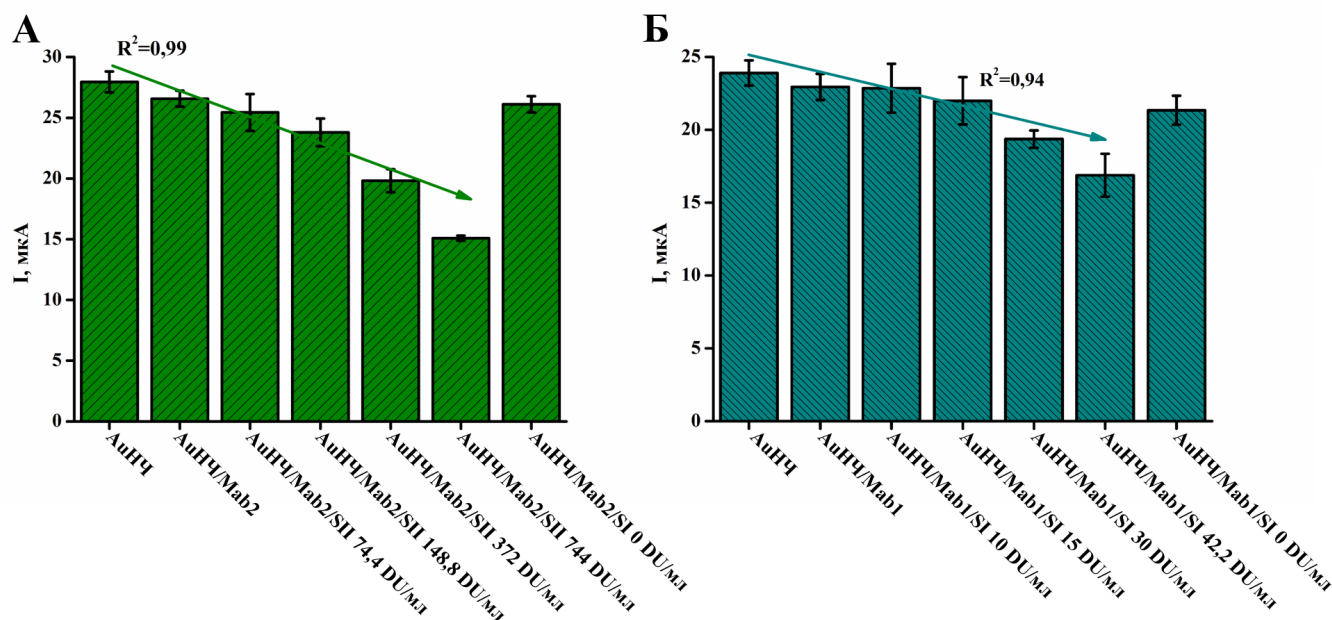
Экспериментально установлено, что оптимальное разведение коммерческих моноклональных антител, иммобилизованных на поверхности модифицированных AuНЧ электродов, составляет 1:600, время отмывки - 30 мин.

На рисунке 2 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы окисления феррицианида калия в присутствии комплекса (А) Mab2-SII и (Б) Mab1-SI при различных концентрациях D-антигена.

При последовательных этапах иммуноанализа (иммобилизация антител, иммобилизация штамма Сэбина вируса полиомиелита) регистрируется снижение сигнала электроокисления феррицианида калия (рис. 2).



**Рисунок 2.** Квадратно-волновые вольтамперограммы окисления феррицианида калия в присутствии (А) комплекса моноклональных антител к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 2 (Mab2) со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инактивированного БПЛ, при различных концентрациях D-антигена (0-744 DU/мл) и (Б) комплекса моноклональных антител к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 1 (Mab1) со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 1, инактивированного облучением ускоренными электронами, при различных концентрациях D-антигена (0-42.2 DU/мл).



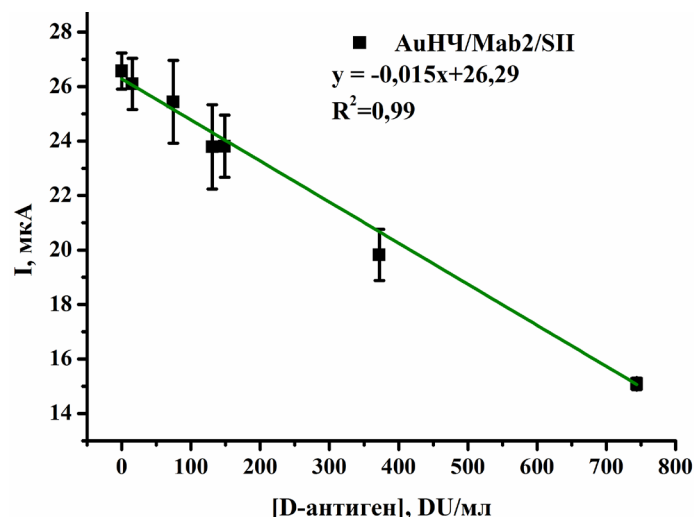
**Рисунок 3.** Диаграммы максимальных амплитуд тока электроокисления феррицианида калия на электродах, модифицированных золотыми наночастицами (AuHЧ), с иммобилизованными (А) моноклональными антителами к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 2 (Mab2) в комплексе со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инактивированного БПЛ, при различных концентрациях D-антигена (0-744 DU/мл); (Б) моноклональными антителами к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 1 в комплексе со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 1, инактивированного облучением ускоренными электронами, при дробном введении дозы 25 кГр и различных концентрациях D-антигена (0-42.2 DU/мл).

С увеличением концентрации D-антигена интенсивность тока пика электроокисления феррицианида калия снижалась в системах Mab2-SII и Mab1-SI (рис. 2 А, Б), так как комплекс антиген-антитело блокировал электронный перенос.

На рисунке 3 представлены диаграммы максимальной амплитуды тока электроокисления феррицианида калия при потенциале  $0.20 \pm 0.01$  В на электродах, модифицированных золотыми наночастицами с иммобилизованными Mab2 и Mab1 в комплексе с соответствующими штаммами Сэбина вируса полиомиелита.

Из диаграммы, представленной на рисунке 3, следует, что интенсивность максимальной амплитуды

тока пика электроокисления феррицианида калия на электроде, модифицированном золотыми наночастицами с иммобилизованными Mab2 или Mab1, снижается на  $9.5 \pm 2.4\%$  относительно электрода, модифицированного только золотыми наночастицами. В присутствии комплекса AuHЧ/Mab2(Mab1)/SII(SI) максимальная амплитуда тока пика электроокисления феррицианида калия снижается с увеличением концентрации D-антигена на  $46.03 \pm 0.75\%$  для штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 при максимальной концентрации D-антигена 744 DU/мл, и на  $29.3 \pm 6.2\%$  для штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 при максимальной концентрации D-антигена



**Рисунок 4.** Зависимость максимальной амплитуды тока электроокисления феррицианида калия от концентрации D-антигена (0-744 DU/мл) штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инаktivированного БПЛ и облучением ускоренными электронами в режиме дробного введения дозы  $10 \times 3$  кГр при  $2-8^\circ\text{C}$  и  $-20^\circ\text{C}$ , в комплексе с Mab2.

42.2 DU/мл. Специфичность разработанного иммуносенсора анализировали на штамме Сэбина вируса полиомиелита типа 1 с несохраненным антигеном. Сигнал электроокисления феррицианида калия снижался на  $6.62 \pm 2.39\%$  относительно электрода, модифицированного только золотыми наночастицами, что статистически незначимо и говорит о специфичности предложенного иммуносенсора (рис. 3).

Электрохимический иммуносенсор, разработанный для штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инаktivированного БПЛ, использовали для анализа этого штамма, инаktivированного ускоренными электронами в режиме дробного введения дозы  $10 \times 3$  кГр при  $2-8^\circ\text{C}$  и  $-20^\circ\text{C}$  с концентрацией D-антигена 15.2 DU/мл и 130.85 DU/мл, соответственно. На рисунке 4 представлена линейная зависимость ( $R^2=0.99$ ) максимальных амплитуд тока электроокисления феррицианида калия от концентрации D-антигена в присутствии комплекса Mab2 со штаммом

Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инаktivированного БПЛ и облучением ускоренными электронами.

На рисунке 5 представлены графики концентрационной зависимости максимальных амплитуд тока электрохимического окисления феррицианида калия в присутствии комплекса (А) Mab2 со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инаktivированного  $\beta$ -пропиолактоном и облучением ускоренными электронами, и комплекса (Б) Mab1 со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 1, инаktivированного облучением ускоренными электронами.

Для расчета предела обнаружения (LOD, уравнение (3)) при электрохимическом иммуносенсорном анализе штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 был взят линейный диапазон низких концентраций D-антигена (0-148.8 DU/мл), предел обнаружения составил 15 DU/мл. Для штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 предел обнаружения равен 9.4 DU/мл.

При переводе DU/мл в М, 1 DU принимали равным 15 нг [41]. Полученное значение концентрации (в нг/мл) переводили в молярную концентрацию по уравнению (4):

$$C = \frac{T}{M} \quad (4),$$

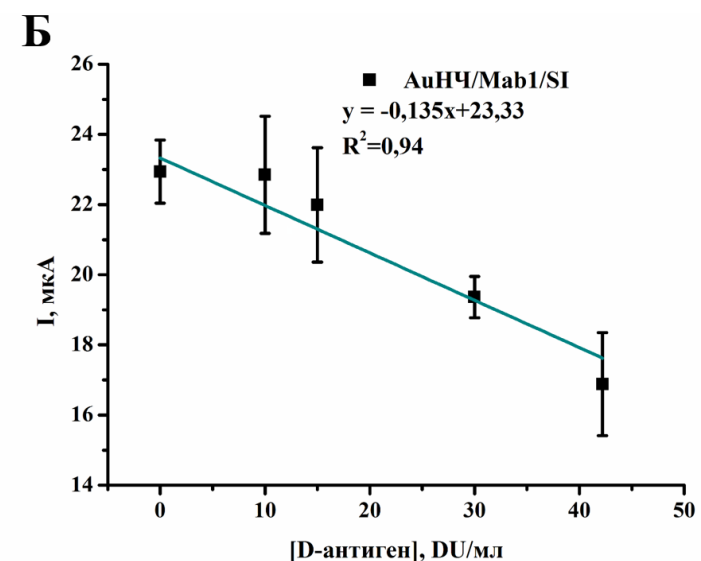
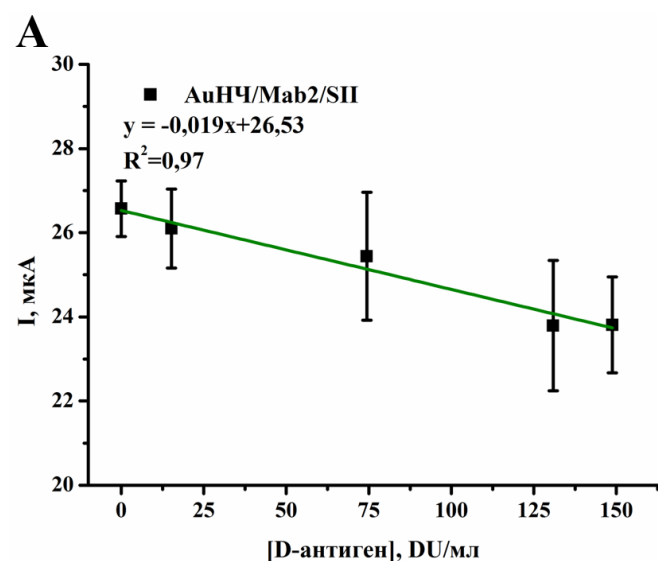
где  $C$  – молярная концентрация антигена (М),  $T$  – титр антигена (г/л),  $M$  – молярная масса антигена, равная 8250000 г/моль [5].

Пределы обнаружения в моль/л комплексов Mab2-SII и Mab1-SI составили 27,3 пМ и 17.1 пМ соответственно.

Полученные результаты сопоставимы с ранее разработанными сенсорными системами с применением сложной многоступенчатой схемы анализа (табл. 2) [16-24].

Расчет константы связывания  $K_b$  для процесса образования комплекса Mab-S (1) проводили по уравнению (2), при постоянной концентрации антител в системе [27]. Перевод DU/мл в М осуществлялся по уравнению (4).

Для расчета константы связывания строили графики линейной зависимости  $\log(1/[D])$  от  $\log([I[\text{Mab-S}]]/[I[\text{Mab}]-$

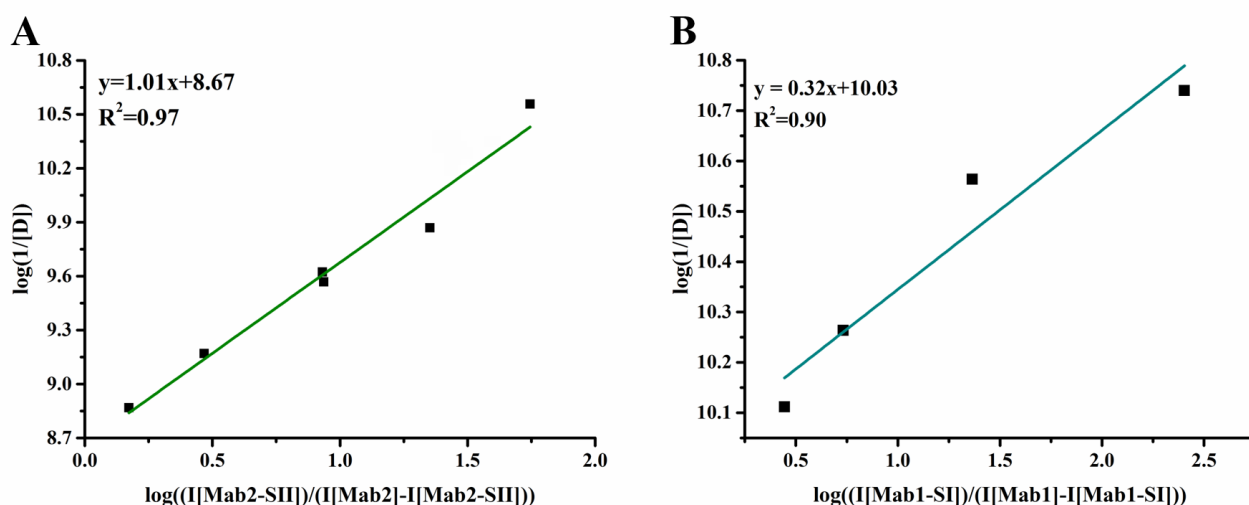


**Рисунок 5.** Зависимость максимальной амплитуды тока электроокисления феррицианида калия в присутствии комплекса (А) Mab2 со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инаktivированного БПЛ и облучением ускоренными электронами, от концентрации D-антигена (0-148,8 DU/мл); (Б) Mab1 со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 1, инаktivированного облучением ускоренными электронами при дробном введении дозы 25 кГр, от концентрации D-антигена (0-42,2 DU/мл).

Таблица 2. Электрохимические стратегии выявления вирусов, описанные в литературе

| Метод определения                        | Модификация электрода   | Объект                                                       | Рабочий диапазон концентраций | Нижний предел обнаружения (LOD) | Ссылка   |
|------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------|
| ДИВА/ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | ЗЭ/11-МУК+3-МПК/Ат/БСА  | Вирус тристеции цитрусовых/<br>Стандартный раствор           | 1 нМ - 5 мкМ                  | 0,27 нМ                         | [16, 24] |
| ДИВА/ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | УЭ/УНТ/Хитозан/Ат       | Вирус гриппа/<br>Стандартный раствор                         | 10-10 <sup>4</sup> БОЕ/мл     | 113 БОЕ/мл                      | [18]     |
| КВВА/ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | ПГЭ/ОГ/Ат/ОМ            | SARS-CoV-2/<br>Стандартный раствор                           | 1 – 1000 нг/мл                | 0,11 нг/мл                      | [19]     |
| ЦВА/ Ферроцен                            | ПЗЭ/11-МУК/Ат/БСА       | Вирус Денге/<br>Стандартный раствор                          | 1 – 25 нг/мл                  | 0,5 нг/мл                       | [20, 21] |
| ЭИС                                      | IDE-Au/ДТСП-COM/Ат/БСА  | Вирус Зика/<br>Стандартный раствор                           | 10 пМ – 1 нМ                  | 10 пМ                           | [22]     |
| ДИВА/ Рибофлавин                         | СУЭ/SH-ГКТ/ AgНЧ/Ат/БСА | Вирус гепатита С/<br>Стандартный раствор/<br>Сыворотка крови | 0,05 пг/мл - 60 нг/мл         | 3 фг/мл                         | [23]     |

**Примечание:** ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, КВВА – квадратно-волновая вольтамперометрия, ЦВА – циклическая вольтамперометрия, ЭИС – электрохимическая импедансная спектроскопия, ЗЭ – золотой электрод, 11-МУК – 11-меркаптоундекановая кислота, 3-МПК – 3-меркаптопропионовой кислотой, Ат – антитела, БСА – бычий сывороточный альбумин, УЭ – электроды на основе углеродной пасты, УНТ – углеродные нанотрубки, ПГЭ – печатный графитовый электрод, ОГ – оксид графена, ОМ – обезжиренное молоко, ПЗЭ – печатный золотой электрод, IDE-Au – межпальцевый электрод из золота, ДТСП-COM – самоорганизующийся монослой дитиобис(сукцинимидилпропионата), СУЭ – стеклоуглеродный электрод, SH-ГКТ – тиолграфеновые квантовые точки, AgНЧ – серебряные наночастицы, БОЭ – бляшкообразующие единицы.



**Рисунок 6.** Зависимость  $\log(1/[D])$  от  $\log([I[\text{Mab2-SII}]/([I[\text{Mab2}]-I[\text{Mab2-SII}]))$  для определения константы связывания комплекса штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 с Mab2 (А); зависимость  $\log(1/[D])$  от  $\log([I[\text{Mab1-SI}]/([I[\text{Mab1}]-I[\text{Mab1-SI}]))$  для определения константы связывания комплекса штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 с Mab1 (Б).

**Таблица 3.** Константы связывания (Kb) штаммов Сэбина вируса полиомиелита типа 2 и типа 1 с моноклональными антителами, полученные методами электрохимического иммуносенсорного анализа и поверхностного плазмонного резонанса

| Комплекс<br>антитело-антиген | Константа связывания, Kb                 |                                        |
|------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|
|                              | Электрохимический иммуносенсорный анализ | Поверхностный плазмонный резонанс [15] |
| Mab2-SII                     | $4.68 \times 10^8 \text{ M}^{-1*}$       | $1.95 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1***}$ |
| Mab1-SI                      | $1.07 \times 10^{10} \text{ M}^{-1**}$   | $2.49 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1***}$    |

Примечание: \* – после инактивации БПЛ и облучением ускоренными электронами; \*\* после облучения ускоренными электронами; \*\*\* – после инактивации БПЛ.

I[Mab-S])) для комплексов SII с Mab2 (рис. 6 А) и SI с Mab1 (рис. 6 Б).

В таблице 3 сопоставлены значения констант связывания для комплексов Mab2-SII и Mab1-SI, полученных методами электрохимического иммуносенсорного анализа и поверхностного плазмонного резонанса при различных способах инактивации.

Разница в величинах Kb соответствующих комплексов антитело-антиген, полученных двумя независимыми методами, вероятно, связана с разными способами инактивации штаммов полиовируса и пробоподготовкой (таблица 3). Значение константы связывания выше  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , говорит о высокоаффинном взаимодействии в системе антитело-антиген и, следовательно, сохранности структуры D-антигена после различных методов инактивации вируса полиомиелита.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан электрохимический иммуносенсор для оценки сохранности D-антигена штаммов Сэбина вируса полиомиелита после инактивации БПЛ и облучением ускоренными электронами на основе феррицианида калия в качестве внешнего электролита и золотых наночастиц для ковалентной иммобилизации моноклональных антител. Определены значения LOD для штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 равные 9.4 DU/мл (17.1 пМ) и 15 DU/мл (27.3 пМ) соответственно. Из полученных данных рассчитаны константы связывания  $4.68 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  и  $1.07 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  комплексов AuНЧ/Mab2-SII и AuНЧ/Mab1-SI соответственно. Электрохимический иммуносенсор может быть применен при разработке методов и условий инактивации вирусов для оценки сохранности антигена с целью получения псевдовиральных частиц и создания противовирусных вакцин.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00471-П, <https://rscf.ru/project/23-15-00471-П/>

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Lentz, K.N., Smith, A.D., Geisler, S.C., Cox, S., Buontempo, P., Skelton, A., DeMartino, J., Rozhon, E., Schwartz, J., Girijavallabhan, V., O'Connell, J., Arnold, E. (1997). Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of the three poliovirus serotypes. *Structure*, 5(7), 961-978. DOI: 10.1016/s0969-2126(97)00249-9
- Bolanos-Martinez, O.C., Strasser, R. (2022). Plant-made poliovirus vaccines – Safe alternatives for global vaccination. *Front. Plant Sci.*, 13, 1046346. DOI: 10.3389/fpls.2022.1046346
- Sutter, R.W., Eisenhawer, M., Molodecky, N.A., Verma, H., Okayasu, H. (2024). Inactivated Poliovirus Vaccine: Recent Developments and the Tortuous Path to Global Acceptance. *Pathogens*, 13(3), 224. DOI: 10.3390/pathogens13030224
- Ferguson, M., Wood, D.J., Minor, P.D. (1993). Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *Journal of General Virology*, 74(4), 685-690. DOI: 10.1099/0022-1317-74-4-685
- Martin, J. (2016). *Poliovirus Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Hertfordshire, UK, pp. 4-317. DOI: 10.1007/978-1-4939-3292-4
- Zhdanov, D. D., Ivin, Yu. Yu., Shishparenok, A. N., Kraevskiy, S. V., Kanashenko, S. L., Agafonova, L. E., Shumyantseva, V. V., Gnedenko, O. V., Pinyaeva, A. N., Kovpak, A. A., Ishmukhametov, A. A., Archakov, A. I. (2023). Perspectives for the creation of a new type of vaccine preparations based on pseudovirus particles using polio vaccine as an example. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 69(5), 253-280. DOI: 10.18097/PBMC20236905253
- Kouivaskiaia, D., Puligedda, D.R., Dessain, S.K., Chumakov, K. (2020). Universal ELISA for quantification of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *Journal of Virological Methods*, 276, 113785. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113785
- Sabbaghi, A., Miri, S.M., Keshavarz, M., Zargar, M., Ghaemi, A. (2019). Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev. Med. Virol.*, 29(6), 2074. DOI: 10.1002/rmv.2074
- Elveborg, S., Monteil, V.M., Mirazimi, A. (2022). Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes. *Pathogens*, 11(2), 271. DOI: 10.3390/pathogens11020271
- Delrue, I., Verzele, D., Madder, A., Nauwynck, H. J. (2012). Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert Rev. Vaccines*, 11(6), 695-719. DOI: 10.1586/erv.12.38
- Uittenbogaard, J.P., Zomer, B., Hoogerhout, P., Metz, B. (2011). Reactions of  $\beta$ -Propiolactone with Nucleobase Analogues, Nucleosides, and Peptides. *The journal of biological chemistry*, 286(42), 36198-36214. DOI: 10.1074/jbc.M111.279232
- Smolko, E.E., Lombardo, J.H. (2005). Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 236, 249-253. DOI: 10.1016/j.nimb.2005.04.055
- Fan, C., Ye, X., Ku, Z., Kong, L., Liu, Q., Xu, C., Cong, Y., Huang, Z. (2017). Beta-Propiolactone Inactivation of Coxsackievirus A16 Induces Structural Alteration and Surface Modification of Viral Capsids. *Journal of Virology*, 91(8), e00038-17. DOI: 10.1128/JVI.00038-17
- Shahi, S., Khorvash, R., Goli, M., Ranjbaran, S. M., Najarian, A., Nafchi, A. M. (2021). Review of proposed different irradiation methods to inactivate food-processing viruses and microorganisms. *Food Science and Nutrition*, 9(10), 5883-5896. DOI: 10.1002/fsn3.2539
- Gnedenko, O. V., Ivin, Yu. Yu., Pinyaeva, A. N., Zyrina, A. N., Levin, I. V., Borisenko, N. S., Zhdanov, D. D., Ivanov, A. S., Lisitsa, A. V., Ishmukhametov, A. A., Archakov, A. I. (2025). The SPR analysis of the interaction of inactivated poliovirus vaccine attenuated strains with antibodies. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 71(1), 59-64. DOI: 10.18097/PBMC1507
- Ozer, T., Geiss, B.J., Henry, C.S. (2020). Review—Chemical and Biological Sensors for Viral Detection. *Journal of the Electrochemical Society*, 167, 037523. DOI: 10.1149/2.0232003JES
- Ribeiro, B. V., Cordeiro, T. A. R., Freitas, G. R. O., Ferreira, L. F., Franco, D. L. (2020). Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. *Talanta Open*, 2, 100-107. DOI: 10.1016/j.talo.2020.100007
- Devarakonda, S., Singh, R., Bhardwaj, J., Jang, J. (2017). Cost-Effective and Handmade Paper-Based Immunosensing Device for Electrochemical

- Detection of Influenza Virus. *Sensors*, 17(11), 2597. DOI: 10.3390/s17112597
19. Yakoh, A., Pimpitak, U., Rengpipat, S., Hirankarn, N., Chailapakul, O., Chaiyo, S. (2021). Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 176, 112912. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112912
20. Dhal, A., Kalyani, T., Ghorai, S., Sahu, N.K., Jana, S.K. (2020). Recent development of electrochemical immunosensor for the diagnosis of dengue virus NS1 protein: A review. *Sensors International*, 1, 100030. DOI: 10.1016/j.sintl.2020.100030
21. Sinawang, P.D., Rai, V., Ionescu, R.E., Marks, R.S. (2016). Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 400-408. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.048
22. Kaushik, A., Yndart, A., Kumar, S., Jayant, R.D., Vashist, A., Brown, A.N., Li, C.-Z., Nair, M. (2018). A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. *Scientific Reports*, 8, 9700. DOI: 10.1038/s41598-018-28035-3
23. Valipour, A., Roushani, M. (2017). Using silver nanoparticle and thiol graphene quantum dots nanocomposite as a substratum to load antibody for detection of hepatitis C virus core antigen: Electrochemical oxidation of riboflavin was used as redox probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 946-951. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.086
24. Haji-Hashemi, H., Norouzi, P., Safarnejad, M.R., Ganjali, M.R. (2017). Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of *Citrus tristeza* virus using modified gold electrode. *Sensors and Actuators B*, 244, 211-216. DOI: 10.1016/j.snb.2016.12.135
25. Agafonova, L. E., Shumyantseva, V. V., Ivin, Yu. Yu., Piniyeva, A. N., Kovpak, A. A., Ishmukhametov, A. A., Budnik, S. V., Churyukin, R. S., Zhdanov, D. D., Archakov, A. I. (2024). Electrochemical profiling of poliovirus particles inactivated by chemical method and ionizing radiation. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 70(3), 161-167. DOI: 10.18097/PBMC20247003161
26. Zhdanov, D.D., Shishparenok, A.N., Ivin, Y.Y., Kovpak, A.A., Piniyeva, A.N., Levin, I.V., Budnik, S.V., Shilov, O.A., Churyukin, R.S., Agafonova, L.E., Berezhnova, A.V., Shumyantseva, V.V., Ishmukhametov, A.A. (2025). Degradation of Poliovirus Sabin 2 Genome After Electron Beam Irradiation. *Vaccines*, 13(8), 824. DOI: 10.3390/vaccines13080824
27. Rafique, B., Khalid, A.M., Akhtar, K., Jabbar, A. (2013). Interaction of anticancer drug methotrexate with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 44, 21-26. DOI: 10.1016/j.bios.2012.12.028
28. Chen, G.-C., Liu, C.-H., Wu, W.-C. (2021). Electrochemical immunosensor for serum parathyroid hormone using voltammetric techniques and a portable simulator. *Analytica Chimica Acta*, 1143, 84-92. DOI: 10.1016/j.aca.2020.11.045
29. Zhou, X., Yang, L., Tan, X., Zhao, G., Xie, X., Du, G. (2018). A robust electrochemical immunosensor based on hydroxyl pillar[5]arene@AuNPs@g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hybrid nanomaterial for ultrasensitive detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 112, 31-39. DOI: 10.1016/j.bios.2018.04.036
30. Gao, S., Guisan, J.M., Rocha-Martin, J. (2022). Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms – A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1189, 338907. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338907
31. Suprun, E., Bulko, T., Lisitsa, A., Gnedenko, O., Ivanov, A., Shumyantseva, V., Archakov, A. (2010). Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(7), 1694-1698. DOI: 10.1016/j.bios.2009.12.009
32. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Vagin, M.Y. et al. (2010). Electrochemical immunoanalysis of cardiac myoglobin. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, 4(3), 237-242. DOI: 10.1134/S1990750810030042
33. Suprun, E.V., Shilovskaya, A.L., Lisitsa, A.V., Bulko, T.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2011). Electrochemical immunosensor based on metal nanoparticles for cardiac myoglobin detection in human blood plasma. *Electroanalysis*, 23(5), 1051-1057. DOI: 10.1002/elan.201000668
34. da Silva, C.T.P., Veregue, F.R., Aguiar, L.W., Meneguim, J.G., Moises, M.P., Favaro, S.L., Radovanovic, E., Giroto, E.M., Rinaldi, A.W. (2016). AuNP@MOF composite as electrochemical material for determination of bisphenol A and its oxidation behavior study. *New Journal of Chemistry*, 40(10), 8872-8877. DOI: 10.1039/C6NJ00936K
35. Yu, A., Liang, Z., Cho, J., Caruso, F. (2003). Nanostructured Electrochemical Sensor Based on Dense Gold Nanoparticle Films. *Nanoletters*, 3(4), 1203-1207. DOI: 10.1021/nl034363j
36. Shumkov, A.A. (2013). *Electrochemical analysis of cardiac markers in blood plasma*. Diss. kand. nauk, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow.
37. Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V., Latsis, I.A., Farafonova, T.E., Ilina, I.Y., Kanashenko, S.L., Moshkovskii, S.A., Kuzikov, A.V. (2023). Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide. *Talanta*, 257, 124341. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124341
38. Yeh, Y.C., Creran, B., Rotello, V.M. (2012). Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871-1880. DOI: 10.1039/c1nr11188d
39. Xiong, C., Yu, Q., Liu, Y., Wang, B., Lu, X., Wang, L., Chen, X. (2025). Rapid and sensitive detection of H1N1 haemagglutinin protein based on a label-free electrochemical DNA aptamer biosensor. *Microchemical Journal*, 210, 112998. DOI: 10.1016/j.microc.2025.112998
40. Bhardwaj, J., Chaudhary, N., Kim, H., Jang, J. (2019). Subtyping of influenza A H1N1 virus using a label-free electrochemical biosensor based on the DNA aptamer targeting the stem region of HA protein. *Analytica Chimica Acta*, 1064, 94-103. DOI: 10.1016/j.aca.2019.03.005
41. Beale, A. J., Ungar, J. (1962). Potency and stability of combined pertussis, diphtheria, tetanus and poliomyelitis (quadruple) vaccine. *Lancet*, 2, 805-808.

Поступила: 06.07.2026

После доработки: 08.09.2026

Принята к публикации: 14.09.2026

## ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR ANALYSIS OF POLIO PSEUDOVIRUS PARTICLES

*A.V. Berezhnova<sup>1\*</sup>, L.E. Agafonova<sup>1</sup>, Yu.Yu. Ivin<sup>1,2</sup>, A.N. Pinyaeva<sup>1,2</sup>, A.A. Kovpak<sup>2</sup>, I.V. Levin<sup>2</sup>, A.A. Ishmukhametov<sup>2</sup>, S.V. Budnik<sup>3</sup>, R.S. Churyukin<sup>3</sup>, D.D. Zhdanov<sup>1</sup>, A.I. Archakov<sup>1,4</sup>, V.V. Shumyantseva<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: alinalikeed@mail.ru

<sup>2</sup>Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 8/1 Moskovsky settlement, Polio Institute settlement, Moscow, 108819 Russia

<sup>3</sup>CEO Teocortex LLC, 34/6 Pervomaysky settlement, Moscow, 108808 Russia

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Pirogov Russian National Research Medical University,  
1 Ostrovitianova st., Moscow, 117997 Russia

To obtain pseudoviral particles for vaccine production, an electrochemical immunosensor was developed to assess the integrity of the D-antigen of the Sabin strain of poliovirus types 2 and 1 after inactivation. Gold nanoparticles obtained by electrosynthesis on the surface of a working graphite electrode were used to immobilize monoclonal antibodies. The increase of the concentration of the antigen was detected as a decline of the peak current of potassium ferricyanide. The limits of detection (LOD) for the Sabin strains of poliovirus types 1 and 2 were determined to be 9.4 DU/ml and 15 DU/ml, respectively (DU/ml - D-antigen units per milliliter, 1 DU = 15ng). The binding constants (K<sub>b</sub>) of the antibody-antigen complexes were calculated and corresponded to  $4.68 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  for Mab2-SII and  $1.07 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  for Mab1-SI. High-affinity interactions ( $K_b \sim 10^8 \text{ M}^{-1} - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) in the antibody-antigen systems indicate the preservation of the D-antigen structure after poliovirus inactivation by means of different methods.

**Key words:** electrochemical immunosensor; poliomyelitis; inactivation; potassium ferricyanide; monoclonal antibodies; gold nanoparticles

## FUNDING

This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 23-15-00471-II)

Received: 06.07.2026, revised: 08.09.2026, accepted: 14.09.2026