

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТАЯ СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИБРИДНОГО БЕЛКА СТРЕПТАВИДИН-ЛЮЦИФЕРАЗА**

Смирнова Д.В., Рубцова М.Ю., Угарова Н.Н.  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119991, РФ  
e-mail: S\_mir\_nova@mail.ru

**Аннотация.** Разработаны аналитические системы для детекции микроорганизмов с использованием гибридного белка люциферазы *Luciola mingrelica* со стрептавидином (His<sub>6</sub>-SA-Luc). Разработан гетерогенный иммуноанализ клеток *Salmonella* с использованием моноклональных биотинилированных антител, позволяющий определять концентрацию клеток в диапазоне 10<sup>4</sup>-5×10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Оптимизирован метод гибридизационного анализа специфических фрагментов ДНК клеток *E. coli*. с пределом обнаружения ДНК 10<sup>-10</sup> М. Показано, что гибридный белок His<sub>6</sub>-SA-Luc является высокочувствительным реагентом при специфической детекции клеток микроорганизмов на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий как с использованием иммуноанализа, так и с использованием гибридизационного анализа специфических фрагментов ДНК клеток микроорганизмов.

**Ключевые слова:** биолюминесценция, ИФА, стрептавидин-люцифераза, гибрид, *Luciola mingrelica*, гибридизационный анализ, *Salmonella*.

**SPECIFIC BIOLUMINESCENT DETECTION OF MICROORGANISMS USING STREPTAVIDIN-LUCIFERASE FUSION PROTEIN**

Smirnova D.V., Rubtsova M.Yu., Ugarova N.N.  
Lomonosov Moscow State University  
leninskie gory St., 1, Moscow, 119991, Russia  
e-mail: S\_mir\_nova@mail.ru

**Abstract.** The analytical systems for specific microorganism detection were developed using streptavidin-luciferase *Luciola mingrelica* fusion protein (His<sub>6</sub>-SA-Luc). Heterogeneous immunoassay is proposed for detection of *Salmonella* cells using monoclonal biotinylated antibodies in range 10<sup>4</sup>-5×10<sup>6</sup> CFU/ml. We optimized hybridization analysis of a specific DNA fragment from *E. coli*. The detection limit for DNA was 10<sup>-10</sup> M. We showed that His<sub>6</sub>-SA-Luc fusion protein is a highly sensitive and specific reagent for microorganism detection based on biotin-streptavidin interaction using or ELISA, or hybridization analysis of a specific DNA fragment from microbial cells.

**Key words:** bioluminescence, ELISA, streptavidin-luciferase, fusion, *Luciola mingrelica*, hybridization analysis, *Salmonella*.

**Введение.** Одной из важнейших задач современной биохимии и биотехнологии является создание новых реагентов и аналитических систем на их основе, способных отвечать постоянно растущим требованиям медицины, экологии и санитарии. Люцифераза светлячков как метка в биоспецифическом анализе имеет ряд преимуществ по сравнению с люциферазами из других источников: (1) высокая чувствительность регистрации метки благодаря высокому квантовому выходу биолюминесцентной реакции, (2) наличие термостабильных высокоактивных мутантов люциферазы с заданными спектральными характеристиками, а также (3) простая процедура наработки и выделения белка в необходимых количествах [1]. Особый интерес представляют гибридные молекулы люциферазы с компонентами, способными образовывать высокоаффинные комплексы с изучаемой мишенью. В частности, стрептавидин-люциферазы, позволяющие фиксировать молекулу люциферазы на поверхности мишени путем высокоспецифичных биотин-стрептавидиновых взаимодействий.

Гибридные белки стрептавидин-люциферазы могут быть получены либо методами химической конъюгации, либо генноинженерными методами. Генноинженерный подход в настоящее время является приоритетным, поскольку позволяет получать гибриды строгой стехиометрии (обычно 1:1) с фиксированным положением специфического домена относительно люциферазы и нарабатывать их в препаративных количествах путем экспрессии его гена в высокоэффективных продуцентах. Преимуществом генноинженерного подхода является также более полное сохранение активности люциферазы в составе гибридного белка по сравнению с методами химической конъюгации. Однако данный метод ограничен доступностью экспрессионной системы, пригодной для наработки гибридного белка. Известны лишь единичные работы, посвященные получению активных гибридных белков стрептавидин-люцифераза. Первые работы по получению гибрида показали, что этот процесс требует существенной оптимизации.

Ранее нами [2] была проведена оптимизация структуры стрептавидин-люциферазы. С использованием гена термостабильной люциферазы *L. mingrelica* (Luc) [3] и минимального участка гена стрептавидина (119 ам.о.) *Streptomyces avidinii* (SA) нами были сконструированы четыре плазмиды, кодирующие гибридные белки стрептавидин-люцифераза, которые различались взаимным расположением генов люциферазы, стрептавидина и полигистидиновой последовательности (His<sub>6</sub>). Было показано, что активность, олигомерный состав и сродство к биотину полученных гибридных белков зависели от структуры гена стрептавидин-люцифераза. Так, присоединение стрептавидина на С-конец люциферазы (Luc-SA-His<sub>6</sub>) привело к существенному снижению люциферазной активности, а так же способствовало образованию агрегатов с низкой биотин-связывающей

способностью. Перемещение гена стрептавидина на N-конец люциферазы привело к более полному сохранению люциферазной активности. Были получены два варианта генов, кодирующий гибрид с различным положением His<sub>6</sub>: SA-Luc-His<sub>6</sub> и His<sub>6</sub>-SA-Luc. Белковый препарат, полученный при экспрессии плазмиды SA-Luc-His<sub>6</sub>, имел неоднородный состав, который помимо олигомеров гибрида включал в себя исходную люциферазу без стрептавидина. Оптимальной оказалась плазида, кодирующая His<sub>6</sub>-SA-Luc, поскольку при ее использовании гибрид нарабатывался преимущественно в тетрамерной форме, обладающей, как высокой люциферазной, так и биотин-связывающей способностью.

Целью данной работы являлась разработка аналитических систем для детекции микроорганизмов с использованием гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc. Были показаны возможности его применения в системах на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий а именно в гетерогенном иммуноанализе клеток *Salmonella* и гибридационного анализе специфических фрагментов ДНК клеток *E. coli*.

#### Материалы и методы.

**Выделение и очистка гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc.** Гибридный белок His<sub>6</sub>-SA-Luc получали путем экспрессии его гена [2], в клетках *E. coli* BL21(DeS)CodonPlus и очищали методом металлохелатной хроматографии, как описано ранее [4]. Полученный препарат белка в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 0.5 М NaCl, 0.3 М имидазола, 2 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитола, хранили при 0 °С.

**Детекция клеток *Salmonella* иммунобиолюминесцентным методом.** По 200 мкл раствора моноклональных мышинных антител против липополисахаридных антигенов клеток *Salmonella* (5 мкг/мл в 0,05М Na-карбонатном буфере pH 9.5) вносили в лунки стрипованного планшета, инкубировали 2 часа при 37 °С, 250 об/мин, промывали 4 раза порциями по 200 мкл буфера PBST (0.01 М Na-фосфат, 0.15 М NaCl, pH 7.4, 0.5 % Tween-20), блокировали свободную поверхность буфером PBS-BSA в течение 2 часов при 37 °С, промывали 3 раза порциями по 200 мкл PBST и использовали для детекции клеток.

Готовили серию последовательных разведений исходной суспензии клеток (10<sup>8</sup> КОЕ/мл в PBS) в буфере PBS с концентрациями клеток от 10<sup>7</sup> до 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. По 100 мкл полученных растворов вносили в лунки планшета с сорбированными на его поверхности антителами и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, 250 об/мин. Планшеты с иммобилизованными клетками 3 раза промывали 200 мкл PBST. Затем в лунки с иммобилизованными клетками вносили по 100 мкл раствора биотинилированных антител (5 мкг/мл в PBST), инкубировали 1,5 ч при 37 °С, 250 об/мин. Несвязавшиеся антитела удаляли четырехкратным промыванием порциями по 200 мкл буфера PBST. После удаления остатков буфера в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора His<sub>6</sub>-SA-Luc с концентрацией 10 нМ, инкубировали 1 ч при 37 °С, 250 об/мин. Несвязавшиеся компоненты реакционной смеси удаляли пятикратным промыванием планшета по 200 мкл PBST. После удаления остатков буфера в лунки вносили по 50 мкл буфера PBS (0.01 М Na-фосфат, 0.15 М NaCl, pH 7.4) и 50 мкл субстратной смеси АТФ-LH<sub>2</sub> и измеряли интенсивность биолюминесценции в отдельных лунках стрипа на люминометре FB 12 Femtomaster (США).

**Гибридационный анализ ДНК. Иммобилизация олигонуклеотидных зондов в лунках полистирольного планшета.** В работе использовали стрипованные полистирольные планшеты высокой сорбционной емкости («Greiner», Германия). Для идентификации клеток *E. coli* использовали зонд 5'-TTTTTTTTTTTAGATTATCAATGACGAATTATATCTTGATG-3' [5]. В качестве отрицательного контроля (NC) использовали зонд 5'-TTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-3'. Для контроля эффективности иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхности планшета использовали зонды NH<sub>2</sub>-TTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-биотин (SC-зонд). Все зонды были модифицированы аминогруппой на 5 конце. Иммобилизацию зондов проводили из буферного раствора 160 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Объем раствора, содержащего иммобилизуемый зонд, составлял от 1 до 30 мкл. Нанесенные олигонуклеотиды высушивали в течение 30-60 мин при 60 °С в зависимости от объема раствора, содержащего зонд. Затем в лунки планшета вносили по 200 мкл раствора PBS, содержащего 1 % BSA, 1 % казеин и инкубировали в течение ночи при 4 °С.

**Модификация полистирольной поверхности плуроником.** В лунки планшета вносили по 200 мкл водного раствора плуроника F108 с концентрацией 10 мг/мл и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После инкубации планшет промывали 3 раза по 200 мкл воды. Планшет высушивали при 60 °С в течение 10 мин. Далее на модифицированную поверхность иммобилизовали зонды по методике, описанной для полистирольного планшета. После высушивания зондов лунки планшета дважды промывали раствором PBS (200 мкл).

**Иммобилизация олигонуклеотидных зондов в лунках полистирольного планшета с использованием полилизина.** В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл раствора полилизина с концентрацией 100 мкг/мл в PBS. Инкубировали 1 ч при 37 °С, 700 об/мин. Дважды промывали буфером PBS (по 200 мкл) по 10 мин, добавляли по 100 мкл 1 %-го раствора глутарового альдегида в 0.01 М Na-карбонатном буфере, pH 9.6. Инкубировали 1 ч при 37 °С, 700 об/мин, промывали 2 раза по 10 мин PBS (200 мкл), затем 10 мин раствором PBS, разбавленным в 10 раз и высушивали в термостате при 60 °С. В подготовленные лунки вносили по 1 мкл раствора олигонуклеотидного зонда в буферном растворе, содержащем 0.31 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, и инкубировали 30 мин при 60 °С. Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора NaBH<sub>4</sub> с концентрацией 7 мг/мл в буфере PBS и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С, 700 об/мин. Лунки промывали 3 раза по 200 мкл PBS, вносили по 200 мкл раствора PBS, содержащего 1 % BSA, 1 % казеин и инкубировали в течение ночи при 4 °С.

**Гибридизационный анализ амплифицированной ДНК.** По 70 мкл раствора определяемой ДНК в буфере, содержащем 0.02 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,3 М  $\text{NaCl}$ , 0,002 М ЭДТА, pH 7,4, вносили в лунки планшета с иммобилизованными зондами и инкубировали при 45 °С в течение часа при перемешивании (1000 об/мин). Несвязавшуюся ДНК удаляли промыванием буфером PBST два раза по 15 мин, 1 раз при температуре гибридизации, 2-й раз - при 37 °С. Затем в лунки планшета вносили 50-150 мкл His<sub>6</sub>-SA-Luc в буфере PBST-BSA, инкубировали 10-90 мин при 37, 23 либо 4 °С, 120 об/мин. Раствор удаляли из лунок и 4 раза промывали буферным раствором PBST по 200 мкл на лунку. В каждую лунку вносили по 100 мкл субстратной смеси ATP-LH<sub>2</sub> и регистрировали биолюминесцентный сигнал на люцинометре FB 12 luminometer (Zylux, United States).

**Результаты и обсуждение.** В биоаналитических системах чувствительность анализа определяется значением фонового сигнала и минимальной детектируемой концентрацией метки, которая характеризуется величиной отклика системы на изменение концентрации аналита. Для гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc линейный диапазон зависимости сигнала от количества белка составляет 10<sup>-18</sup>-10<sup>-13</sup> моль/лунка, что и обуславливает его высокий потенциал применения в биоаналитических системах.

**Детекция клеток *Salmonella* иммунобиолюминесцентным методом.** Детекцию инактивированных клеток *Salmonella* проводили с использованием схемы двухстадийного сэндвич-анализа (см. рис. 1) по методу, разработанному в работе [6]. Образующиеся специфические иммунокомплексы биотинилированных антител с поверхностным липополисахаридным антигеном микробных клеток детектировали с использованием гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc.

Согласно полученным результатам, минимально определяемая концентрация клеток составила 10<sup>4</sup> КОЕ/мл. Чувствительность данного метода сопоставима с чувствительностью как традиционных иммунометодов с использованием пероксидазы в качестве метки, так и методов на основе люцифераз светлячков, в которых предел обнаружения варьируется от 7,3·10<sup>4</sup> КОЕ/мл до 2,3·10<sup>7</sup> КОЕ/мл в зависимости от состава селективной среды и природы улавливающего агента. Таким образом, на примере разработанного метода показано успешное применение His<sub>6</sub>-SA-Luc в иммуноанализе микроорганизмов с использованием биотинилированных антител.

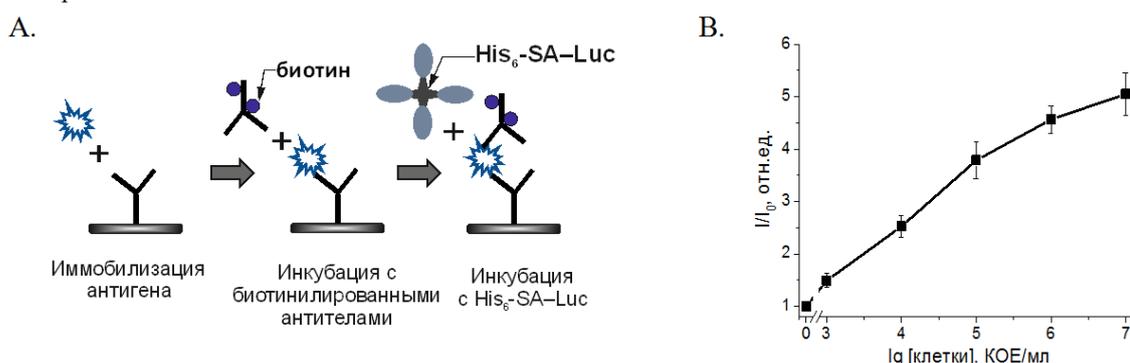


Рисунок 1 – А. Схема детекции клеток *Salmonella* с использованием биотинилированных и небитинилированных антител и гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc; В. Зависимость отношения I/I<sub>0</sub> от концентрации клеток *Salmonella* с использованием His<sub>6</sub>-SA-Luc

**Гибридизационный анализ ДНК с использованием гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc.** Специфическую идентификацию клеток *E. coli* осуществляли методом гибридизационного анализа ДНК по наличию уникального для данных клеток фрагмента гена *gadB* (174 bp), кодирующего глутаматдекарбоксилазу [7]. ДНК выделяли из образца, амплифицировали методом ПЦР с использованием специфических праймеров, на этой же стадии вводили биотин с использованием dUTP-11-биотина. Целевая меченая ДНК взаимодействовала с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом. Биотин в образовавшихся дуплексах ДНК выявляли с использованием гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc (см. рис. 2). В качестве специфического зонда использовали олигонуклеотид, содержащий 30 оснований, который иммобилизовали в лунках 96-луночного полистирольного планшета. Для увеличения расстояния между зондом и поверхностью лунки использовали ножку из 13 оснований тимидина.

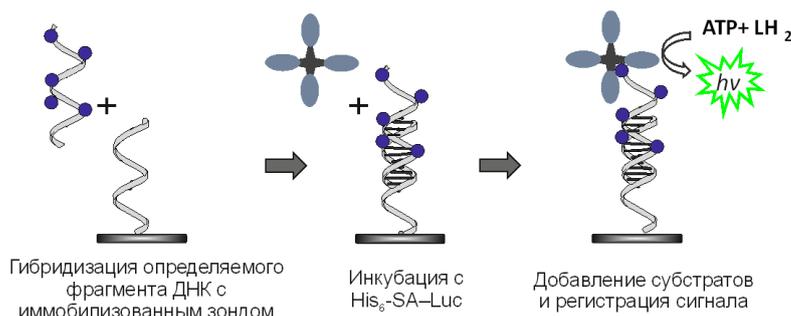


Рисунок 2 – Схема анализа ДНК с использованием биолюминесцентного метода детекции

Результаты предварительных экспериментов показали, что в условиях гетерогенного анализа основная проблема использования люциферазы светляков в качестве выявляющей метки заключается в высоком значении фонового сигнала, связанного с неспецифической сорбцией люциферазы на поверхности носителя. Для выявления условий, при которых фоновый сигнал может быть снижен, мы сравнили несколько методов модификации поверхности лунок полистирольного планшета перед иммобилизацией олигонуклеотидного зонда. Для модификации (в данном случае «гидрофилизации») поверхности полистирола использовали: а) полилизин и б) плюроник F108. Полилизин ранее был успешно использован для модификации полистирольной поверхности при иммобилизации ДНК-зондов [8]. При этом иммобилизация зонда может осуществляться как за счет электростатических взаимодействий положительно заряженных аминогрупп полилизина с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК-зонда, так и за счет образования ковалентных связей при использовании глутарового альдегида как сшивающего агента. Для плюроника так же были получены положительные результаты по снижению неспецифической сорбции белков на гидрофобной поверхности полистирола, в частности, - люциферазы светляков [9]. Плюроник – тройной блок-сополимер с центральным гидрофобным полиоксипропиленовым блоком и двумя концевыми гидрофильными полиоксиэтиленовыми блоками. Модификация поверхности плюроником заключается в том, что его центральный гидрофобный блок прочно сорбируется на полистирольной поверхности и экранирует ее. Иммобилизация зонда происходит на незаряженной гидрофилизованной поверхности полистирола.

В лунки полистирольного планшета с модифицированной и немодифицированной поверхностью вносили раствор гибридного белка и регистрировали биoluminesцентный сигнал (фон). Те же эксперименты повторяли, используя планшеты, на поверхности которых предварительно был иммобилизован модельный биотинилированный SC-зонд (суммарный сигнал). Отношение фонового сигнала к суммарному определяли как неспецифический сигнал, обусловленный неспецифической сорбцией His<sub>6</sub>-SA-Luc. Оказалось, что на поверхности, обработанной полилизинем, неспецифический сигнал в 150 раз превышал величину неспецифического сигнала для немодифицированной поверхности. Поэтому при использовании гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc для детекции биотинилированной ДНК полилизин не мог быть использован. Предварительная обработка полистирольной поверхности плюроником, наоборот, приводила к десятикратному снижению неспецифической сорбции гибридного белка. Поэтому дальнейшую оптимизацию условий гибридного анализа ДНК мы проводили с использованием поверхности, обработанной плюроником.

Были получены зависимости биoluminesцентного сигнала от количества иммобилизуемого биотинилированного зонда (0-20 пмоль/лунка) при различных концентрациях His<sub>6</sub>-SA-Luc (0.2-10 нМ) в присутствии постоянного количества амплифицированной ДНК (40 нг в объеме 70 мкл), либо в ее отсутствие (фоновый сигнал) (см. рис. 3А).

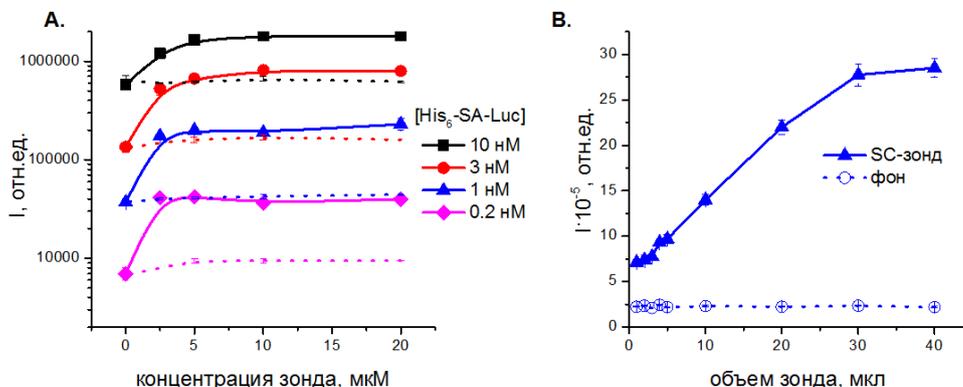


Рисунок 3 – А. Зависимость биoluminesцентного сигнала от концентрации иммобилизованного олигонуклеотидного зонда в присутствии и в отсутствие определяемой ДНК (пунктир) при различных концентрациях His<sub>6</sub>-SA-Luc; В. Зависимость биoluminesцентного сигнала от объема наносимого зонда при его количестве 10 пмоль/лунка и 3 нМ His<sub>6</sub>-SA-Luc

При концентрации 3 и 10 нМ His<sub>6</sub>-SA-Luc насыщающее количество зонда составило 10 пмоль/лунка, а при концентрации 0.2 и 1 нМ His<sub>6</sub>-SA-Luc – 2.5 пмоль/лунка. Неспецифическая сорбция гибридного белка при 10 нМ His<sub>6</sub>-SA-Luc была в два раза выше, чем при остальных концентрациях. Дальнейшие эксперименты проводили при насыщающем количестве зонда 10 пмоль/лунка и при концентрации His<sub>6</sub>-SA-Luc 3 нМ. Увеличение объема иммобилизуемого олигонуклеотида от 1 до 30 мкл при постоянном его количестве в лунке позволило увеличить специфический сигнал в 6 раз при постоянном фоновом сигнале (см. рис. 3В). Это можно объяснить увеличением доступности центров связывания молекул зонда с молекулами комплементарной ДНК и гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc. При дальнейшем увеличении объема зонда соотношение сигнал:фон не изменялось. Поэтому оптимальный объем зонда составил 30 мкл.

Температура влияла на длительность установления равновесия в системе иммобилизованная ДНК-гибридный белок His<sub>6</sub>-SA-Luc: при оптимальной температуре, 37 °С, равновесие достигалось за 60 мин,

при 25 °С - за 90 мин, а при 4 °С - более 90 мин. При этом отношение фонового сигнала (в отсутствие определяемой ДНК) к специфическому не зависело от времени, температуры инкубации и от используемого объема гибридного белка His<sub>6</sub>-SA-Luc (50-150 мкл).

В оптимизированных условиях (10 пкмоль зонда/лунка, объем зонда 30 мкл, 3 нМ Luc-SA, объем Luc-SA 100 мкл, инкубация при 37 °С, 1 час) мы получили калибровочную кривую зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации ДНК. Предел обнаружения составил 10<sup>-10</sup> М ДНК, что эквивалентно 0.4 нг ДНК/лунку

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гибридный белок Luc-SA является эффективным реагентом для специфической детекции клеток микроорганизмов как с использованием иммуноанализа, так и в системах на основе детекции ДНК. Следовательно, His<sub>6</sub>-SA-Luc может быть использован в качестве универсального реагента для разработки новых высокочувствительных систем на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий.

#### **Список литературы / References:**

1. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Approaches to engineer stability of beetle luciferases. *Computational and structural biotechnology journal*, 2012, vol. 2, pp. 1-7.
2. Smirnova D.V., Koksharov M.I., Zorov I.N., Ugarova N.N. Luciferase-streptavidin fusion proteins: Preparation and properties. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2014, vol. 69, pp. 56-61.
3. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution. *Protein Eng. Des. Sel*, 2011, vol. 24, pp. 835-844.
4. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Triple substitution G216N/A217L/S398M leads to the active and thermostable *Luciola mingrelicafirefly* luciferase. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, vol. 10, pp. 931-938.
5. Quiñones B., Swimley M.S., Narm K.-E., Patel R.N., Cooley M.B., Mandrell R.E. O-antigen and virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a rapid and cost-effective DNA microarray colorimetric method. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012, vol. 2, pp.1-10.
6. Koksharov M.I., Smirnova D.V., Abbasova S.G., Ugarova N.N. A fusion protein of *Luciola mingrelica* luciferase with a biotin-binding domain: Production, properties, and application. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2011, vol. 66, pp. 241-246.
7. Smith D.K., Kassam T., Singh B., Elliott J.F. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, pp. 5820-5826.
8. Li W., Li J. *High speed quantitative analysis of DNA methylation, by immobilization of DNA on the plastic carrier coated with polylysine, then incubating at a two-phase temperature and immunodetection of 5-methylcytosine structures as markers of DNA methylation*, 2010, US 778579382.
9. Lomakina G.Y., Istrate A., Rudenko N.V., Ugarova N.N. Synthesis and application of firefly luciferase antibody conjugates in a bioluminescent immunoassay of *Salmonella* cells. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2014, vol. 69, pp. 49-55.

### **НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА В КАРБОКСИМЕТИЛХИТИНЕ В ПРИСУТСТВИИ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ И МЕТИЛГАЛЛАТА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ: ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОРФОЛОГИЯ**

Широкова Л.Н.<sup>1</sup>, Дубинчук В.Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

Ленинский просп., 29, г. Москва, 119991 ГСП-1, РФ

e-mail: shirokova@ips.ac.ru

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт минерального сырья им. Н.М. Федоровского

Старомонетный пер., 31, г. Москва, 119017, РФ

**Аннотация.** Разработан одностадийный процесс перевода наночастиц серебра из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор карбоксиметилхитина в присутствии антиоксидантов посредством ультразвукового облучения, исключая промежуточную стадию получения водной дисперсии наночастиц серебра. В макромолекулярной системе на основе карбоксиметилхитина и наночастиц серебра в присутствии антиоксидантов галловой кислоты и метилгаллата было отмечено усиление эффекта стабилизации наночастиц серебра. Показано, что стабилизация наночастиц серебра в системе карбоксиметилхитин–наночастицы серебра в присутствии метилгаллата осуществлялась наиболее эффективно, что обусловлено различной природой заместителей в карбоксильной группе антиоксиданта.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, карбоксиметилхитин, галловая кислота, метилгаллат, ультразвук.