

УДК 543.25

БИОСЕНСОРЫ И ИММУНОСЕНСОРЫ

© 1995г. В.Е.Курочкин, В.Б. Теровский

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 23.05.95

Обзор современного состояния и тенденций развития исследований в области биосенсоров. Основное внимание уделяется применению биосенсоров в иммунном анализе.

В последние два десятилетия большое внимание в области аналитического приборостроения уделяется направлению, связанному с разработкой и применением хемо- и биосенсоров. В биосенсорах характерные для современных физических приборов простота и оперативность измерений сочетаются с высокой специфичностью биологических реакций. В них "работает" тот же принцип молекулярного узнавания, который обеспечивает строгую упорядоченность метаболизма в живой природе.

Основными элементами, как хемо-, так и биосенсора являются рецептор и преобразователь (иногда в отечественной литературе без перевода употребляется термин "трансдуктор"). Химическая информация (концентрация определяемого вещества в пробе) в результате взаимодействия с рецептором переходит в форму энергии, которая далее превращается преобразователем в полезный аналитический сигнал. По рекомендациям IUPAC [1], биосенсором называют хемосенсор, рецептор которого содержит биологические компоненты (ферменты, антитела, клеточные органеллы или целые клетки, срезы животных или растительных тканей и т.д.). Таким образом, это определение биосенсора носит структурный характер. Иногда в литературе понятие биосенсора определяют с функциональной точки зрения — как устройство для анализа биологически активных веществ [2].

Биологический компонент рецептора может быть иммобилизован на поверхности или в объеме твердой фазы (зерна сорбента, мембраны, оптического волокна и т.д.) или удерживаться в области, где происходит биоспецифическое взаимодействие, с помощью

полупроницаемой мембраны. По степени интегрированности конструкции биосенсоров варьируются в широких пределах: от слоя биомолекул, связанных непосредственно с поверхностью преобразователя (например, электрода), до устройств с пространственным и временным разделением процессов в рецепторе и преобразователе (в качестве примера можно привести колоночный реактор с детектированием продукта реакции на выходе). Такое разнообразие вариантов определяется в первую очередь широчайшим кругом задач, для решения которых могут быть использованы биосенсоры. Типичной для них является задача оперативного (часто — в режиме реального времени) определения одного или нескольких заранее известных компонентов в сложной по химическому составу смеси. Основные преимущества биосенсоров при решении подобных задач (перед такими мощными и универсальными методами, как хроматография или масс-спектрометрия) заключаются в значительно более низкой стоимости и сокращении времени анализа. Но в конкретных условиях более существенными могут оказаться другие полезные качества биосенсоров: биосовместимость, портативность, возможность массовых анализов в полевых условиях, отсутствие требований высокой квалификации обслуживающего персонала и т.д.

КЛАССИФИКАЦИЯ БИОСЕНСОРОВ

По типу процесса в рецепторе. По способу генерации первичного сигнала биосенсоры разделяются на три группы:

1. "Прямые", "биоаффинные" ("аффинные"), "необратимые" ("необратимого связывания").

В биосенсорах этой группы полезным сигналом являются изменения физических величин (потенциала, заряда, показателя преломления, диэлектрической проницаемости и т.д.), происходящие непосредственно в результате специфического связывания определяемого вещества с рецептором.

2. "Ферментные", "ферментные/метаболические", "(био)каталитические"¹, "обратимые".

Эта группа объединяет биосенсоры, в которых определяемое вещество является субстратом (кофактором, активатором, ингибитором) реакции, катализируемой входящим в состав рецептора ферментом (комплексом ферментов, органеллами, клетками, срезами тканей и т.д.).

3. "Гибридные", "с усилением", "с меткой".

Они применяются в тех случаях, когда результат связывания определяемого вещества с рецептором не может быть зарегистрирован непосредственно (например, из-за недостаточно высокой чувствительности). Для измерений в биосенсорах этой группы одновременно с пробой (или после инкубации с пробой – в зависимости от используемого метода) вводится вспомогательный реактив, содержащий конъюгат молекулы определяемого вещества (или комплементарного к нему – в неконкурентных методах) с молекулой "метки". В качестве метки используются ферменты, флуорофоры, люминофоры, радиоактивные изотопы и т.д. Полученный в результате вспомогательной реакции сигнал, величина которого зависит от концентрации определяемого вещества в пробе, поступает на вход преобразователя.

На практике выбор типа рецептора определяется конкретными условиями задачи. Например, ферментные биосенсоры более других подходят для продолжительных измерений в режиме реального времени, контроля технологических процессов. Аффинные биосенсоры, которые являются "безреагентными" – т.е. не требуют дополнительных реактивов и регистрация сигнала в них начинается сразу после введения пробы – наиболее пригодны для быстрого детектирова-

ния опасных веществ, создания одноразовых устройств [4, 5]. Гибридные системы позволяют достигать очень высокой чувствительности. Характерный диапазон определяемых концентраций для ферментных биосенсоров – от мМ до мкМ, для аффинных – от мкМ до нМ и для гибридных – от пМ до аМ [6]. Иногда биосенсор нельзя однозначно отнести к какой-либо из рассмотренных групп: например, в случае использования каталитических свойств антител [7] или антигенов [8], применения в качестве рецепторов липидных мембран с ионными каналами [9] или использования липосом [10].

По принципу действия преобразователя. Если процессы, происходящие в рецепторе, определяют основные свойства биосенсора – его специфичность и селективность – и жестко связаны с поставленной задачей, то в выборе способа преобразования энергии допускается значительно большая свобода. Преобразователь (как правило) не селективен по отношению к определяемому веществу. Поэтому простой заменой активного компонента биосенсора (например, мембраны с иммобилизованным ферментом или антителом) можно изменить его специфичность в соответствии с условиями конкретной задачи. В связи со значительными успехами, достигнутыми к настоящему времени в области технологии и производства, проблема преобразователя не является основной на пути создания практически применяемых биосенсоров. Узким местом здесь остается разработка рецепторов – причем, как с точки зрения подготовки биоактивной поверхности, так и с точки зрения выяснения деталей механизма происходящих процессов [11].

Ниже приводится классификация биосенсоров по принципу действия преобразователя, основанная на рекомендациях IUPAC по номенклатуре химических сенсоров [1]. В нее не включены преобразователи для измерения магнитных свойств и радиоактивных излучений, т.к. их применение в биосенсорах в литературе не описывалось.

- 1) Оптические биосенсоры:
 - (a) поглощения;
 - (b) отражения;
 - (c) люминесцентные;
 - (d) флуоресцентные;

¹ Иногда термин "каталитические" применяют к биосенсорам группы 3 [3]

- (e) рефрактометрические;
- (f) оптотермические;
- (g) светорассеяния.
- 2) Электрохимические биосенсоры:
 - (a) вольтамметрические (включая амперометрические);
 - (b) потенциометрические.
- 3) Электрические биосенсоры (часто объединяются в одну группу с электрохимическими – отличаются тем, что в них не происходит электрохимических процессов):
 - (a) электролитической проводимости;
 - (b) диэлектрической проницаемости.
- 4) Гравиметрические биосенсоры:
 - (a) объемных акустических волн (пьезоэлектрические);
 - (b) поверхностных акустических волн.
- 5) Термометрические биосенсоры (измеряют тепловой эффект реакции или адсорбции).

Существуют и другие возможности классификации биосенсоров: по области применения (например, биосенсоры для иммунного анализа), по определяемому веществу (глюкозные биосенсоры), по потреблению энергии [12] и т.д. Ниже будет более подробно рассмотрено применение биосенсоров в иммунном анализе.

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ИММУННОГО АНАЛИЗА (ИММУНОСЕНСОРЫ)

Современные методы иммунного анализа можно разделить на две группы: прямые – основанные на детектировании непосредственного результата взаимодействия антигена с антителом, и непрямые – с использованием радиоактивной, ферментной, флуоресцентной, люминесцентной метки. Непрямые методы, в свою очередь, делятся на гомогенные и гетерогенные. К гетерогенным относятся методы, включающие стадию разделения свободного и связанного меченого компонента. В гомогенных (separation-free) методах стадия разделения отсутствует: они основаны на различии величины регистрируемого сигнала от свободного и связанного меченого компонента (при образовании иммунного комплекса может измениться, например, активность фермента – метки или интенсивность флуоресценции). В биосенсорах для иммунного анализа (или иммуно-

сенсорах) могут использоваться и прямые, и непрямые методы – выбор метода зависит от конкретного назначения. Иммуносенсор для измерений в режиме реального времени, скорее всего, должен быть основан на прямом или гомогенном методе. А для создания высокочувствительного иммуносенсора необходимо использовать меченные компоненты и системы "с усилением" (amplified), даже за счет значительного увеличения времени измерения. Применение наиболее изощренных методов иммунного анализа теоретически позволяет довести предел обнаружения до одной микробной или вирусной частицы или до нескольких сотен молекул [13, 14]. В отдельных экспериментальных работах удавалось подойти довольно близко к этим показателям: до 2800 молекул белка [15, 16] и до 50 клеток в мл раствора [17].

Уникальная избирательность иммуносенсоров обеспечивается высокой аффинностью реакции между антигеном и антителом: значения константы равновесия этой реакции достигают 10^{11} M^{-1} [18]. Но в то же время очень малые значения константы диссоциации комплекса (10^{-5} сек^{-1} для белковых антигенов [18]) делают эту реакцию практически необратимой. (Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что иммунный комплекс на поверхности твердой фазы вообще не находится в состоянии динамического равновесия [19]). Таким образом, перед повторным измерением должна быть проведена регенерация иммуносенсора – диссоциация комплекса антиген-антитело на его рабочей поверхности. Обычно стадия регенерации проводится в среде с низким значением pH, высокой ионной силой или высокой концентрацией хаотропного соединения. Введение добавочной стадии увеличивает время анализа и приводит к частичной потере активности связанного компонента. Поэтому на практике более реалистической возможностью может оказаться замена иммуноактивной поверхности (например, мембраны) после каждого измерения либо использование одноразовых сенсорных элементов [17, 20].

Еще одной серьезной проблемой в разработке иммуносенсоров является неспецифическая сорбция на поверхности рецептора. Именно неспецифическая сорбция, а не чувствительность преобразователя или свойства иммобилизованного биологического компонента ограничивает возможности определения низких концентраций в большинстве описанных в литературе иммуно-

сенсоров.

Таким образом, свойства не только активного компонента рецептора, но и "пассивного" — подложки, мембраны, поверхности кварцевого кристалла и т.д. — являются определяющими для получения устройств с высокими характеристиками.

ИММУНОСЕНСОРЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПРЯМЫХ МЕТОДАХ

Образование комплекса антиген-антитело на поверхности твердой фазы непосредственно приводит к изменению целого ряда физических величин. Большинство описанных в литературе прямых иммуносенсоров основано на регистрации изменений плотности заряда, массы вещества в поверхностном слое, диэлектрической проницаемости, показателя преломления.

Иммуносенсоры, основанные на измерениях электрических величин

Методы, основанные на использовании электрических эффектов адсорбции слоя молекул на поверхности электрода могут быть разделены на два класса: 1) измерения полного сопротивления (импеданса) электрода и 2) измерения электрического потенциала [21]. Соответственно, все описанные иммуносенсоры, измеряющие электрические эффекты, подразделяются на емкостные (или диэлектрометрические) и потенциометрические.

Потенциометрические иммуносенсоры. В эту группу обычно объединяют два типа сенсоров: потенциометрические иммуносенсоры и иммуночувствительные полевые транзисторы (immunoFET).

Первый иммуноэлектрод был описан Janata в 1975 году [22]. Он представлял собой платиновую проволоку с осажденной ПВХ-мембраной, на которой был иммобилизован лектин конканавалин А. Потенциал электрода изменялся после выдерживания его в растворе, содержащем полисахарид. Подобный (но более слабый) отклик наблюдался на введение овальбуминовых антител для электрода, на мембране которого был иммобилизован овальбумин. Несколько позже

был описан иммуноэлектрод на основе титановой проволоки, покрытой слоем окиси титана с иммобилизованным хориогонадотропином, для определения соответствующих антител [23]. (В этой же работе проверялась и обратная система: определение хориогонадотропина электродом со связанными антителами). Иммуносенсор, состоящий из хлоридсеребряного электрода и ацетатцеллюлозной мембраны был применен для определения антител к антигену Вассермана [24] и антител групповой специфичности крови [25]. В последующие годы были описаны различные конструкции иммуноэлектродов для определения антител и белковых антигенов [26 - 29], вирусных [30] и клеточных [31] суспензий. Показано, что потенциометрический иммуноэлектрод мог определить иммуноглобулин G в концентрации до 10 нг/мл [27].

Точный механизм, связывающий специфическую реакцию на иммуноэлектроде с изменением его потенциала, пока неизвестен. В качестве альтернативных возможностей такого механизма в литературе рассматривались образование двойного электрического слоя на поверхности электрода [32], экранирование заряда мембраны при образовании комплекса на ее поверхности [24], изменение процессов ионного транспорта в мембране вследствие специфической сорбции белка (аналогично открыванию ионных каналов в биологических мембранах) [33], формирование смешанного потенциала [34]. В группу потенциометрических иммуноэлектродов включаются еще два типа устройств, использующих влияние специфической сорбции на процесс ионного транспорта через мембрану. Первый из них представляет собой электрод с ион-селективной мембраной, содержащей конъюгат ионофора с низкомолекулярным антигеном (гаптенем) [35 - 39]. Образование на поверхности мембраны комплекса антигена с содержащимися в пробе антителами приводит к уменьшению концентрации ионофора в объеме мембраны и к изменению потенциала электрода. Большинство описанных иммуноэлектродов этого типа использовали мембрану, селективную к ионам калия, и поэтому при измерениях концентрация K^+ должна была поддерживаться постоянной. Это требование представляет значительные неудобства (особенно при анализе биологических проб). Поэтому было предложено перейти от использования калийселективных мембран к протонселективным [39]. Практически применение иммуноэлектродов с конъюгированным ионофором, по-видимому,

ограничено только анализом низкомолекулярных антигенов и антител к ним (из-за проблем, связанных с подвижностью и растворимостью в мембранной фазе больших молекул).

Устройства второго типа (ion channel-type sensor) содержат бислойную липидную мембрану с включенными в нее природными рецепторами [40 - 48]. Связывание определяемого вещества с рецептором приводит к открыванию "ионных каналов" — скачкообразно увеличивается проницаемость мембраны для ионов. Применение таких сенсоров для иммунного анализа пока не описано, но является вполне возможным при использовании мембран, содержащих клеточные рецепторы антигенов или антител.

Принцип иммуночувствительного полевого транзистора впервые был описан Schenk [44]. В области затвора транзистора наносится слой специфических антител. При образовании комплекса с антигеном заряд белкового слоя изменяется, что приводит к изменению заряда в инверсионном слое транзистора и к изменению протекающего тока. Однако реализация этого простого принципа на практике вызывает значительные трудности. В частности, было обнаружено, что такой иммуносенсор очень чувствителен к влиянию неорганических ионов и реально измеряемой величиной является смешанный потенциал [34]. На основании этих данных Janata квалифицировал все ранее полученные в области потенциометрических иммуносенсоров результаты, как артефакты [45, 46]. Он предположил, что создание истинного потенциометрического иммуносенсора возможно только при условии получения идеально поляризованной поверхности [46].

Проблема практически применимого полевого транзистора для иммунного анализа остается пока дискуссионной. В работе [47] был продемонстрирован линейный отклик иммуночувствительного полевого транзистора с мембраной из поливинилбутираля на антитела к сывороточному альбумину в диапазоне концентраций $10^{-7} - 10^{-5}$ М. Новый подход к решению проблемы был применен в работах [48, 49]. Он заключается в использовании относительно толстой (до 5 мкм) пористой мембраны, в которую могли проникать ионы электролита. При этом изменение потенциала связано не с поляризацией поверхности полупроводника, а с перераспределением ионов в мембране в соответствии с законом Доннана.

Отсутствие адекватного теоретического

описания процессов в потенциометрических иммуносенсорах является серьезной проблемой в развитии этого направления анализа. В литературе существует два подхода к рассмотрению механизма происходящих процессов. Первый — предполагает, что изменения, происходящие в результате иммуноспецифической реакции на поверхности твердой фазы, описываются теорией двойного электрического слоя. Второй — исходит из модели электрохимического потенциала и существования распределения Доннана. Первый подход применялся для описания проволочных электродов [32, 50] и полевых транзисторов с гидрофобными мембранами [34, 46], второй — для анализа отклика мембранных электродов [24, 51, 52] и полевого транзистора с гидрофильной мембраной [48, 49]. Возможность объединения этих двух подходов обсуждается в работе [53], в которой построена модель, связывающая электростатический и электрохимический потенциал.

Диэлектрометрические (емкостные) иммуносенсоры. Связывание антигенов или антител с поверхностью приводит к образованию (или изменению толщины и/или диэлектрических свойств) двойного электрического слоя. При этом изменение величины емкости зависит от концентрации определяемого вещества в пробе [54 - 58]. На практике обычно измеряют изменение импеданса, т.к. считается, что индуктивная и активная составляющие сопротивления электрода слабо зависят от образования комплекса. Предел обнаружения иммуноглобулина в емкостных иммуносенсорах составлял около 1 нг/мл [55, 56]. Описано применение емкостного иммуносенсора для анализа в режиме реального времени в проточной ячейке [56].

Оптические иммуносенсоры

В оптических иммуносенсорах прямого связывания используется то обстоятельство, что образование комплекса антиген-антитело приводит к локальному изменению коэффициента преломления. Описана регистрация иммуноспецифической реакции на поверхности кварцевой пластинки методами

эллипсометрии [19, 59] и рефлексометрии [60] с пределом обнаружения иммуноглобулина 1–10 мкг/мл — одинаковым для обоих методов. Иммуносенсор, основанный на распространении световой волны (evanescent wave) в волноводе, с внешней поверхностью которого связаны антитела, описан в [61]. Образование иммунного комплекса на поверхности волновода изменяет условия отражения на границе и изменение амплитуды волны на выходе пропорционально количеству связанного антигена. Этим методом определялся метотрексат в концентрации до 270 нМ.

В интегрально-оптических биосенсорах на поверхность волновода [62, 63] или кварцевого кристалла [64] наносится дифракционная решетка. Локализация иммунохимической реакции в области дифракционной решетки позволяет регистрировать несколько нг белка [62].

Одним из наиболее перспективных направлений в разработке прямых иммуносенсоров признается использование резонанса поверхностных плазмонов. Плазмонный резонанс возникает при падении света под определенным углом на границу тонкой металлической пленки с диэлектриком — коллективное возбуждение делокализованных электронов металла приводит к резкому уменьшению интенсивности отраженного света. Угол падения, при котором наблюдается резонанс, очень чувствителен к показателю преломления среды, на величину которого влияет образование иммунного комплекса на поверхности [65 - 69]. Метод обладает высокой чувствительностью: продемонстрирована возможность определения белка в концентрации 28 нг/мл [69].

Пьезоэлектрические иммуносенсоры

Два типа устройств, основанных на пьезоэлектрическом эффекте могут использоваться для регистрации иммуноспецифической реакции: сенсоры на объемных акустических волнах (BAW, bulk acoustic wave) и сенсоры на поверхностных акустических волнах (SAW, surface acoustic wave).

BAW-сенсоры основаны на изменении резонансной частоты кварцевого кристалла при увеличении его массы за счет образования комплекса на поверхности. В SAW-сенсорах используется зависимость параме-

тров распространяющейся в пьезоэлектрике волны (амплитуды, частоты, фазы) от состояния поверхности. Первые пьезоэлектрические сенсоры использовались для анализа в газовой фазе. Поскольку иммунохимическая реакция происходит обычно в водной среде, понятно, что практически применимый иммуносенсор должен быть адаптирован для измерений в жидкости. Это связано с серьезными трудностями, так как жидкая среда демпфирует колебания кристалла. В первых работах, посвященных применению этого метода для иммунного анализа, после проведения иммунохимической реакции кристалл перед измерением высушивался [70 - 72]. Позднее была показана возможность регистрации иммунохимической реакции непосредственно в водных растворах с использованием как SAW- [73, 74], так и BAW-сенсоров [75 - 77]. Однако достигнутая в этих работах чувствительность недостаточна для практических применений [73]. (Следует отметить, что чувствительность ограничивалась не возможностями самой схемы регистрации, а высоким уровнем неспецифической сорбции). Отмечается также, что изменение резонансной частоты при измерениях в жидкости иногда имеет знак, обратный теоретически предсказанному эффекту [78].

ИММУНОСЕНСОРЫ, ОСНОВАННЫЕ НА НЕПРЯМЫХ МЕТОДАХ

Гомогенные иммуносенсоры. Как отмечалось выше, необходимым условием для создания гомогенного иммуносенсора обычно является достаточно сильное влияние связывания определяемого вещества с меченым компонентом на величину выходного сигнала. Это влияние может проявляться в изменении скорости ферментативной реакции [79], интенсивности флуоро- [80, 81] или хемилюминесценции [82] и т.д. Однако, в работе [83] предложен гомогенный иммуносенсор (по конструкции аналогичный описанному в [61]), основанный на другом принципе. В этом сенсоре распространяющаяся по кварцевому волноводу световая волна возбуждает флуоресценцию только тех молекул метки, которые связаны в комплекс на внешней поверхности волновода, но из-за быстрого затухания не действует на молекулы метки, находящиеся в растворе. В гомогенных иммуносенсорах может быть достигнут пре-

дел обнаружения не хуже 10 нг/мл белка — как в работе [84], где флуоресцентная метка вводилась не только в стандартный антиген (как обычно), но и в иммобилизованные на поверхности оптического волокна антитела. Это позволяло различить сигнал от связавшегося в комплекс меченного антигена и от находящегося в растворе.

Гетерогенные иммуносенсоры. Гетерогенные методы характеризуются тем, что в них собственно иммунохимическая реакция и реакция проявления связанной (или наоборот — несвязанной) метки (стадия усиления) разделены во времени. Причем, первая (иммунохимическая) стадия с целью достижения максимальной чувствительности обычно доводится до состояния равновесия. При необходимости гетерогенный метод может включать несколько стадий усиления ("каскадное усиление") — например, фермент-маркер катализирует реакцию, продукт которой является субстратом для второго фермента и т.д. Выходной сигнал при этом определяется концентрацией продукта, образовавшегося в последнем каскаде усиления. Для регистрации сигнала в гетерогенных иммуносенсорах могут использоваться (в зависимости от свойств метки) электрохимические [15, 16, 85 - 90], оптические [91 - 93], калориметрические [94, 95] и другие методы. Сокращение полного времени анализа в гетерогенных методах может быть достигнуто, главным образом, за счет уменьшения длительности первой стадии (обычно реакция образования иммунного комплекса на поверхности твердой фазы требует для своего завершения (в зависимости от условий) от 30 мин. до 2-х часов), а также, за счет проведения измерений в проточном [89, 91 - 94] или в проточно-инжекционном режиме [90]. Одно измерение в проточном режиме занимает (включая стадию регенерации) 12 - 15 мин. При этом может быть определено до 1 мкг/мл белка [85, 89, 90]. Значительно более высокая чувствительность (для иммуноферментных электродов — 1 нг/мл [90], и даже — 0,01 нг/мл [15]) достигалась в тех работах, где иммунохимическая стадия проходила до установления равновесного состояния. Причем продолжительность этой стадии обычно не включалась авторами во время анализа.

ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ БИОСЕНСОРОВ

Разнообразие современных направлений в области биосенсоров связано как с огромным числом практических задач, так и с отсутствием очевидного превосходства какого-либо одного или нескольких типов устройств над другими. Может быть отмечено несколько основных тенденций (направлений) исследований, посвященных биосенсорам.

- Создание безреагентных датчиков (reagentless, probe), в которых измерение начинается сразу же после приведения их в контакт с пробой. Их преимущества: простота, экономия реагентов, возможность анализа в режиме реального времени.
- Создание одноразовых (disposable) био- и иммуносенсорных элементов [17, 96]. В области иммуносенсоров это решает проблему необратимости реакции между антигеном и антителом.
- Миниатюризация — приводит к экономии как биологического материала (что очень существенно, например, для клинического анализа), так и к уменьшению расхода реактивов. Особенно важна для измерений *in vivo* и для разработки имплантируемых устройств.
- Многофункциональность — возможность одновременного анализа двух или более определяемых веществ [97, 98].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hulanicki A., Glab S., Lugman F.* // Pure Appl. Chem. 1991. Vol.63, №9. P.1247.
2. *Soderberg L.* Biosensors: Proc. Symp. Roy. Swed. Acad. Eng. Sci., Stockholm. 1985. P.5.
3. *Sheller F., Schubert F., Pfeiffer D. e.a.* // Analyst. 1989. Vol. 114. №6. P.653.
4. *Behizad M., Cumming R.H., Rowell F.J. e.a.* // Process Biochem. 1989. Vol. 24, №4. P.126.
5. *Taylor R.F., Marenchic L.G., Cook E.J.* // Anal. Chim. Acta. 1988. Vol.213, №1. P.131.
6. *Lowe C.R., Yon Hin B.Y.J., Cullen D.C.* // J.Chromatogr. 1990. Vol.510, P.347.
7. *Green B.S., Taufik D.S.* // Trends Biotechnol. 1989. Vol.7, №1. P.304.

8. *Ивницкий Д.Н., Юлаев М.Ф., Кашкин А.П.* // Журн. аналит. химии. 1989. Т.7, №10. С.1868.
9. *Krull U.J., Nikolelis D.P., Brennan J.D. e.a.* // Anal. Proc. 1991. Vol.28, №11. P.370.
10. *Umezawa Y., Sofue S., Takamoto Y.* // Anal. Lett. 1982. Vol.15, №2. P.135.
11. *Taylor R.F.* // Biotech. USA: Proc.6Th Annu. Int. Conf. San Francisco. 1989. P.275.
12. *Thompson M., Krull U.J.* // Anal. Chem. 1991. Vol.63, №7. P.393 A.
13. *Jackson T.M., Ekins R.P.* // J. Immunol. Meth. 1986. Vol.87, №1. P.13.
14. *Lewis R.* // Bioscience. 1989. Vol.39, №5. P.288.
15. *Aizawa M., Morioka A., Suzuki S.* // Anal. Chim. Acta. 1980. Vol.115, №1. P.61.
16. *Halsall H.B., Heineman W.R., Jenkins S.H.* // Clin. Chem. 1988. Vol.34, №9. P.1701.
17. *Hadas E., Soussan L., Rosen-Margalit I. e.a.* // J. Immunoassay. 1992. Vol.13, №2. P. 231.
18. *Егоров А.М., Духов М.Н.* // Ж. Всес. хим. общества. 1982. Т.27, №4. С.21.
19. *Nygren H., Czerkinsky C., Stenberg M.* // J. Immunol. Meth. 1985. Vol.85, №1. P.87.
20. *Green M.J., Hilditch P.* // Anal. Proc. 1991. Vol.28, №11. P.374.
21. *Bergveld P.* // Biosens. Bioelectr. 1991. V.6, №1. P.55.
22. *Janata J.* // J. Amer. Chem. Soc. 1975. Vol.97, №10. P.2914.
23. *Yamamoto N., Nagasawa Y., Shuto S. e.a.* // Chem. Lett. 1978. №3. P.245.
24. *Aizawa M., Kato S., Suzuki S.* // J. Membr. Sci. 1977. Vol.2, №2. P.125.
25. *Aizawa M., Kato S., Suzuki S.* // J. Membr. Sci. 1980. Vol.7, №1. P.1.
26. *Tanigushi I., Yasukouchi K., Tsuji I.* // EP 193 154. 1985.
27. *Tanigushi I., Yasukouchi K., Tsuji I., Fujiyosi T.* // EP 293 969. 1987.
28. *Su D.Z., Zhang Z., Wang L.* // Shengwuhua xue yu shengwuwuli Jinzan. 1985. Vol.6, №6. P.73.
29. *Lu M.X., Fang D., Shen Q. e.a* // Тяньцзань дасюэ сюэбао. 1991. №3. P.1.
30. *Теровский В.Б., Рейфман Л.С., Полякова Т.И.* // Научное приборостроение. Л.: Наука. 1987. С.19.
31. *Matsuoka H., Karube I., Nguven T.K.H., Suzuki S.* // Denki kagaku. 1982. Vol.50, №12. P.946.
32. *Yamamoto N., Nagasawa Y., Sawai M. e.a.* // J. Immunol. Meth. 1978. Vol.22. №3-4. P.309.
33. *Ивницкий Д.М., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д. и др.* // Журн. аналит. химии. 1991. Т.46, №5. С.999.
34. *Collins S., Janata J.* // Anal. Chim. Acta. 1982. Vol.136, №1. P.93.
35. *Solsky R.L., Rechnitz G.A.* // Anal. Chim. Acta. 1979. Vol.24, P.138.
36. *Solsky R.L., Rechnitz G.A.* // Anal. Chim. Acta. 1981. Vol.44, №1. P.135.
37. *Connell G.R., Sanders K.M., Williams R.L.* // Biophys. J. 1983. Vol.45, №1. P.123.
38. *Keating M.Y., Rechnitz S.A.* // Anal. Chem. 1984. Vol.56, №4. P.801.
39. *Bush D.L., Rechnitz G.A.* // Fresenius Z. Anal. Chem. 1986. Vol.323, №5. P.431.
40. *Thompson M., Krull U.J., Bendell Y.L.I. e.a.* // Anal. Chim. Acta 1985. Vol.173, P.129.
41. *Krull U.J., Thompson M.* // IEEE Trans. Electron. Devices. 1985. Vol.32, P.1180.
42. *Sugawara H., Kojima K., Sazawa H., Umezawa Y.* // Anal. Chem. 1987. Vol.59, P.2842.
43. *Umezawa Y., Sugawara H., Kataoka M., Odashima K.* // Proc. 5th Symp. Ion- Selec. Electrodes. Matrafured. 1988. 1989. P.211.
44. *Schenck J.F.* // U.S. Patent 4.238.757. 1980.
45. *Janata J.* // Anal. Proc. 1987. Vol.24, №11. P.326.
46. *Janata J.* // Proc.Conf. "Biotech 84": World Biotech. Rept. 1984. Vol.1, P.355.
47. *Gotoh M., Tamiga E., Karube I.* // J. Membr. Sci 1989. Vol.41, P.291.
48. *Schasfoort R.B.M., Kooyman R.P.H., Bergveld P., Greve J.* // Biosens. Bioelectron. 1990. Vol.5, №2. P.103.

49. Schasfoort R.B.M., Bergveld P., Kooyman R.P.H., Greve J. // Anal. Chim. Acta. 1990. Vol.238, №2. P.323.
50. Buck R.P. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1986. Vol.82, №4. P.1169.
51. Теровский В.Б. // Журн. аналит. химии. 1989. Т.44, №8. С.1447.
52. Теровский В.Б. // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №9. С.1815.
53. Oshima H., Ohki S. // Biophys. J. 1985. Vol.47, №5. P.673.
54. Hertl W. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1987. Vol.17, №1. P.89.
55. Bataillard P., Gardies F., Jaffrezic-Renault N. e.a. // Anal. Chem. 1988. Vol.60, №21. P.2374.
56. Gebbert A., Alvarez-Jeaza M., Stocklein W., Schmid R.G. // Anal. Chem. 1992. Vol.64, №9. P.997.
57. Billard V., Hartelet C., Binder P., Therasse J. // Anal. Chim. Acta. 1991. Vol.249, №2. P.367.
58. Taylor R.F., Marenchic I.G., Spencer R.H. // Anal. Chim. Acta. 1991. Vol.249, №1. P.67.
59. Nygren H., Kaartinen M., Stenberg M. // J. Immunol. Meth. 1986. Vol.92, №2. P.219.
60. Welin S., Elwing H., Arwin H. e.a. // Anal. Chim. Acta. 1984. Vol.163, P.263.
61. Sutherland R.H., Dahne C., Place J.F., Ringrose A.S. // Clin. Chem. 1984. Vol.80, №9. P.1533.
62. Nellen P.M., Tienfeuthaler K., Lukocz W. // Sens. Actuators. 1988. Vol.15, №15. P.1285.
63. Spehn P.K., Prenosil J.E., Tienfeuthaler K. // Anal. Lett. 1990. Vol.23, №3. P.411.
64. Tsay Y.G., Lin C.I., Lee J. e.a. // Clin. Chem. 1991. Vol.37. №9, P.1502.
65. Flanagan M.T., Pantell R.H. // Electron. Lett. 1984. Vol.20, P.968.
66. Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. // Sens. Actuators. 1983. Vol.4, P.229.
67. Cullen D.C., Brown R., Lowe C.R. // Biosensors. 1987-88. Vol.3, №4. P.211.
68. Fagerstam L.G., Frostell A., Karlsson R. e.a. // J. Mol. Recogn. 1990. Vol.3, №1. P.83.
69. Kooyman R.P.H., Leuferin A.T.M., Eenink R.G., Greve J. // Anal. Chem. 1991. Vol.63, №1. P.83.
70. Shons A., Dorman F., Najarian J. // J. Biomater. Med. Res. 1972. Vol.6, P.565.
71. Oliveira R.J., Silver S.F. // U.S.Patent. 4.242.096. 1988.
72. Muramatsu H., Kajiwara K., Tamiya E., Karube I. // Anal. Chim. Acta. 1986. Vol.188, P.257.
73. Roederer J.E., Bastiaans G.J. // Anal. Chem. 1983. Vol.55, №14. P.2333.
74. Bastiaans G.J. // U.S.Patent 4 735 906. 1988.
75. Davis K.A., Leary T.R. // Anal. Chem. 1989. Vol.61, №11. P.1227.
76. Thompson M., Arthur C.L., Dhaliwal G.K. // Anal. Chem. 1986. Vol.58, P.1206.
77. Thompson M., Dhaliwal G.K., Arthur C.L., Calabrese G.S. // IEEE Trans. Ultrasonics, Ferroelectrics, Freq. Cont. 1987. Vol.UFEC-34. P.127.
78. Ngen-Ngwainbi J., Suleiman A.A., Guilbault G.G. // Biosens. Bioelectron. 1990. Vol.5, №1. P.13.
79. Fonong T., Rechnitz G.A. // Anal. Chem. 1984. Vol.56, P.2586.
80. Lin B.L., Schults J.S. // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1986. Vol.BME-33, №2. P.133.
81. Lee C.S., Huang P.Y., Ayres D.H. // Anal. Chem. 1991. Vol.63, №5. P.464.
82. Аренков П.Я., Березин В.А., Стародуб Н.Ф. // Укр. биохим. журн. 1991. Т.63, №4. С.99.
83. Sutherland R.H., Dahne C., Place J.F., Ringrose A.S. // J.Immunol. Meth. 1984. Vol.74, №2. P.253.
84. Аренков П.Я., Стародуб Н.Ф., Березин В.А. // Журн. аналит. химии. 1992. Vol.47, №5. P.1874.
85. Mattiasson B., Nilssen H. // FEBS Lett. 1977. Vol.78, №2. P.251.
86. Boitieux J.-L., Desmet G., Thomas D. // Clin. Chem. 1979. Vol.25, №2. P.318.
87. Aizawa M., Ikariyama Y., Toyoshima T. // Kobunshi ronbun. 1984. Vol.41, №4. P.257.
88. Ивницкий Д.Н., Дзантиев Б.Б., Каукин А.П., Егоров А.М. // Прикл. биохим. микробиол. 1985. Т.21, №6. С.821.
89. Boitieux J.-L., Biron M.-P., Thomas D. // Anal. Chim. Acta. 1989. Vol.222, №2. P.235.

90. *Lee I.H., Meyerhoff M.E.* // *Anal. Chim. Acta.* 1990. Vol.229, №1. P.47.
91. *Dannert S., Bachas L.G., Ashcan G.S., Meyerhoff M.E.* // *Anal. Chem.* 1990. Vol.62, №3. P.314.
92. *Bright F.V., Betts T.A., Litwiller K.S.* // *Anal. Chem.* 1990. Vol.62, №10. P.1065.
93. *Bowyer J.R., Alarie J.P., Sepaniak H. e.a.* // *Analyst.* 1991. Vol.116, №2. P.117.
94. *Birnbaum S., Bulow L., Hardy K. e.a.* // *Anal. Biochem.* 1986. Vol.158, №1. P.12.
95. *Danielsson B.* // *J. Biotechnol.* 1990. Vol.15, №3. P.187.
96. *Green M.J., Hilditch P.I.* // *Anal. Proc.* 1991. Vol.28, №11. P.374.
97. *Ekins R.P.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1989. Vol.7, №2. P.155.
98. *Cullen D.C., Sethi R.S., Lowe C.R.* // *Anal. Chim. Acta.* 1990. Vol.229, №1. P.47.