

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

©2017 г.

Д. В. СОТНИКОВ,  
А. В. ЖЕРДЕВ, Б. Б. ДЗАНТИЕВ

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Разнообразие биоаналитических форматов. III. Метки, используемые в биоанализе. IV. Ключевые понятия и процессы для моделирования биоаналитических систем. V. Модели различных биоаналитических форматов. VI. Теоретические оценки возможностей биоаналитических систем. VII. Проточные биоаналитические системы. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Биоаналитические методы – это методы детекции, основанные на взаимодействии выявляемого вещества с рецепторными молекулами биологической природы. В качестве таких молекул могут применяться антитела, ферменты, поверхностные рецепторы клеток, комбинаторные соединения неантительной природы, олигонуклеотиды, пептиды, лектины и пр. [1]. Способность некоторых биологических молекул специфически распознавать молекулу-мишень делает их идеальным инструментом для обнаружения целевых соединений в сложных многокомпонентных смесях. Поэтому биоаналитические подходы нашли широкое применение как для рутинных лабораторных измерений в медицинской и ветеринарной диагностике, экологическом мониторинге, обеспечении биобезопасности и многих других областях, так и в качестве исследовательских инструментов для получения новой информации о структуре и свойствах молекулярных объектов различной природы.

---

*Принятые сокращения:* ИФА – иммуноферментный анализ; ИХА – иммунохроматографический анализ; ППР – поверхностный плазмонный резонанс; ПФИА – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РИА – радиоиммунный анализ; RU – resonance units.

*Адрес для корреспонденции:* dzantiev@inbi.ras.ru

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-01131).

Развитие биоаналитических методов показало перспективность двух методических решений. Первое – это использование различных меток, включаемых в реагенты и входящих в состав образующихся в ходе анализа и детектируемых комплексов. Работа с метками благодаря возможности их высокочувствительного выявления в ряде случаев снижает пределы детекции на несколько порядков. Второе решение – это иммобилизация на носителе одного из реагентов с возможностью отделения (отмывки) непрореагировавших молекул – избытка реагентов, компонентов пробы и др. Хотя безмаркерные и безразделительные методы тоже широко известны и даже долгое время доминировали в биоаналитической диагностике – иммуно-преципитация, иммуноагглютинация, иммуноэлектрофорез и др., в настоящее время они занимают ограниченную нишу. Теоретические описания таких аналитических систем подробно изложены в ряде публикаций [2–6] и не рассматриваются в нашем обзоре.

Математическое моделирование является неотъемлемой частью теории функционирования аналитического метода. Построение и анализ математической модели способствует пониманию механизмов происходящих в системе процессов, дает объяснение различных негативных явлений и помогает их устранению. Модели также обладают прогностической функцией, позволяя без долгих трудоемких экспериментов оценить влияние на результат анализа различных факторов и параметров. Хотя теоретическая модель лишь частично соответствует реальному объекту, она отражает общие закономерности функционирования системы. Как правило, модель аналитического метода считается разработанной, если она позволяет рассчитать концентрацию детектируемого комплекса на основании изначально заданных параметров: концентраций реагентов, констант взаимодействия, продолжительности стадий анализа и др. Установленная теоретическая зависимость [начальная концентрация аналита] – [концентрация детектируемого комплекса] описывает градуировочную кривую анализа. На основании данной зависимости можно рассчитывать оптимальные соотношения реагентов и продолжительности стадий, такие параметры анализа, как предел детекции, динамический диапазон и др.

Математическое моделирование системы может быть осуществлено посредством точного решения в общем виде описывающих систему уравнений (аналитическое моделирование) или нахождения приближенного решения для конкретных значений параметров посредством пошаговых численных расчетов (численное моделирование). Современные компьютерные технологии позволяют численно моделировать многокомпонентные системы с учетом

множества параллельно протекающих реакций, поливалентных взаимодействий, диффузионных и других процессов [7–14]. Однако для понимания функционирования аналитических систем предпочтительны нечисленные (аналитические) решения. Хотя такие решения существуют только для самых простых моделей, они активно используются для выработки рекомендаций по усовершенствованию биоаналитических методик [15, 16].

Настоящий обзор фокусируется на представленных в литературе моделях различных биоаналитических форматов и путях достижения предельных аналитических характеристик, которые следуют из этих моделей. Рассматриваются многообразие существующих моделей и их эволюция. Систематизированы и унифицированы описания биоаналитических систем, предлагаемые в различных работах.

## II. РАЗНООБРАЗИЕ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ФОРМАТОВ

Разнообразие предложенных в разное время методов биохимического анализа очень велико и классифицируется по-разному. Ситуация ещё более усложняется из-за того, что в зависимости от способа классификации и сферы использования один и тот же метод получает разные названия. Описания различных форматов биоаналитических систем, общие принципы их разработки изложены в ряде обзоров [17–22].

Рассмотрим одну из возможных классификаций биоаналитических форматов на примере иммуноанализа.

Все методы иммуноанализа можно разделить, исходя из структуры определяемого антигена. Первую группу составят моновалентные антигены, взаимодействующие только с одной молекулой антитела, а ко второй группе отнесем поливалентные антигены, способные присоединять несколько антител. Первую группу формируют низкомолекулярные соединения: пестициды, антибиотики, пептиды и т.п. Биополимеры и корпускулярные структуры (вирусы, клетки) – характерные поливалентные антигены.

В аналитических системах с моновалентными антигенами комплексообразование антиген–антитело не регистрируется напрямую\*. В них реализуются конкурентные схемы анализа, для которых возможны два варианта: мечение антитела и иммобилизация антигена или мечение антигена и иммобилизация антитела.

---

\* Прямая регистрация возможна, но она предполагает отказ от базовых преимуществ современных аналитических систем – применения метки для выявления иммунных комплексов и носителя для разделения иммунореагентов.

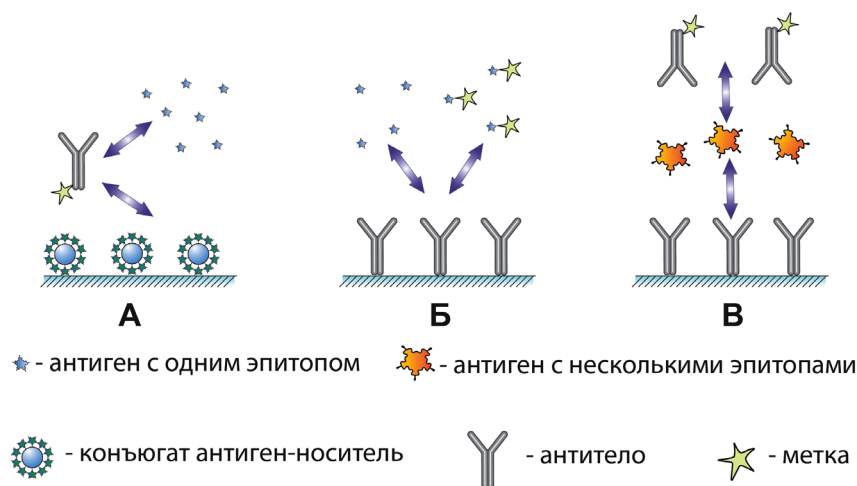


Рис. 1. Основные форматы иммуноанализа. Буквенные обозначения поясняются в тексте статьи.

В первом случае (рис. 1, А) за центры связывания антител конкурируют два антигена – свободный, содержание которого в пробе измеряется, и иммобилизованный, вносимый в систему в некотором выбранном количестве. После взаимодействия антитела, связавшиеся с иммобилизованным антигеном, остаются на носителе, а остальные антитела (в том числе прореагировавшие с антигеном в растворе) вымываются. Чем больше свободного антигена было в пробе, тем меньшее количество метки связывается с носителем и детектируется на нем по завершении анализа (обратная зависимость между концентрацией аналита и регистрируемым сигналом).

Так как взаимодействие в системе включает две реакции, то анализ можно проводить, меняя порядок взаимодействия иммунореагентов: одновременно инкубируя антитела и оба вида антигенов (рис. 2, А); прединкубируя антитела и детектируемый антиген с последующим взаимодействием антител и иммобилизованного антигена (рис. 2, Г); проводя взаимодействие иммобилизованного антигена с мечеными антителами, а затем добавляя детектируемый антиген для перевода части связавшихся антител в раствор (рис. 2, Ж).

Изменение длительности каждой стадии позволяет сдвигать диапазон детектируемых концентраций антигена.

Во втором случае (рис. 1, Б) анализ представляет собой взаимодействие между иммобилизованными антителами и двумя видами

антигена – меченым, концентрация которого нам известна, и немеченым, содержащимся в пробе в неизвестной (определяемой) концентрации. Оба вида антигена конкурируют за центры связывания иммобилизованных антител. В результате их соотношение в составе комплексов с антителами отражает исходное соотношение в растворе. Чем больше антигена в пробе, тем меньше связывается с антителами меченый антиген и тем меньше метки оказывается в составе комплекса на носителе (обратная зависимость между концентрацией анализа и регистрируемым сигналом).

Такой анализ, как и в предыдущем случае, можно осуществить тремя способами:

– одновременно добавить к иммобилизованным антителам меченые и немеченые антигены (рис. 2, Б);

– осуществить взаимодействие между антителами и немеченым антигеном, а потом добавить меченый антиген (рис. 2, Д);

– провести сначала реакцию антител с меченым антигеном, а затем добавить немеченый антиген (рис. 2, И); в результате меченый антиген будет вытесняться немеченым из комплексов с антителами.

Рассмотрим теперь аналитические методы с поливалентными антигенами. В принципе, для них тоже можно провести конкурентный анализ, однако большую чувствительность обеспечивает формирование тройных, так называемых «сэндвич» комплексов (иммобилизованное антитело – антиген – меченое антитело) (рис. 1, В). Связывание с избытком иммобилизованных антител приводит к концентрированию антигена и создает предпосылки для очень высокой чувствительности анализа [23]. Такая система теоретически способна выявить даже одну молекулу антигена, связавшуюся с антителом, так как уменьшение фонового сигнала и рост чувствительности детекции метки снижают порог выявления антигена потенциально неограниченно [24]. Отметим, что в «сэндвич»-анализе зависимость между концентрацией анализа и регистрируемым сигналом (количеством связанной метки) прямая, в отличие от конкурентного анализа.

Этот подход также можно реализовать тремя последовательностями взаимодействий:

– одновременной инкубацией антигена с мечеными и немечеными антителами (рис. 2, В);

– взаимодействием антигена сначала с мечеными антителами, а затем – с немечеными (рис. 2, Е);

– взаимодействием антигена сначала с немечеными антителами, а затем – с мечеными (рис. 2, К).

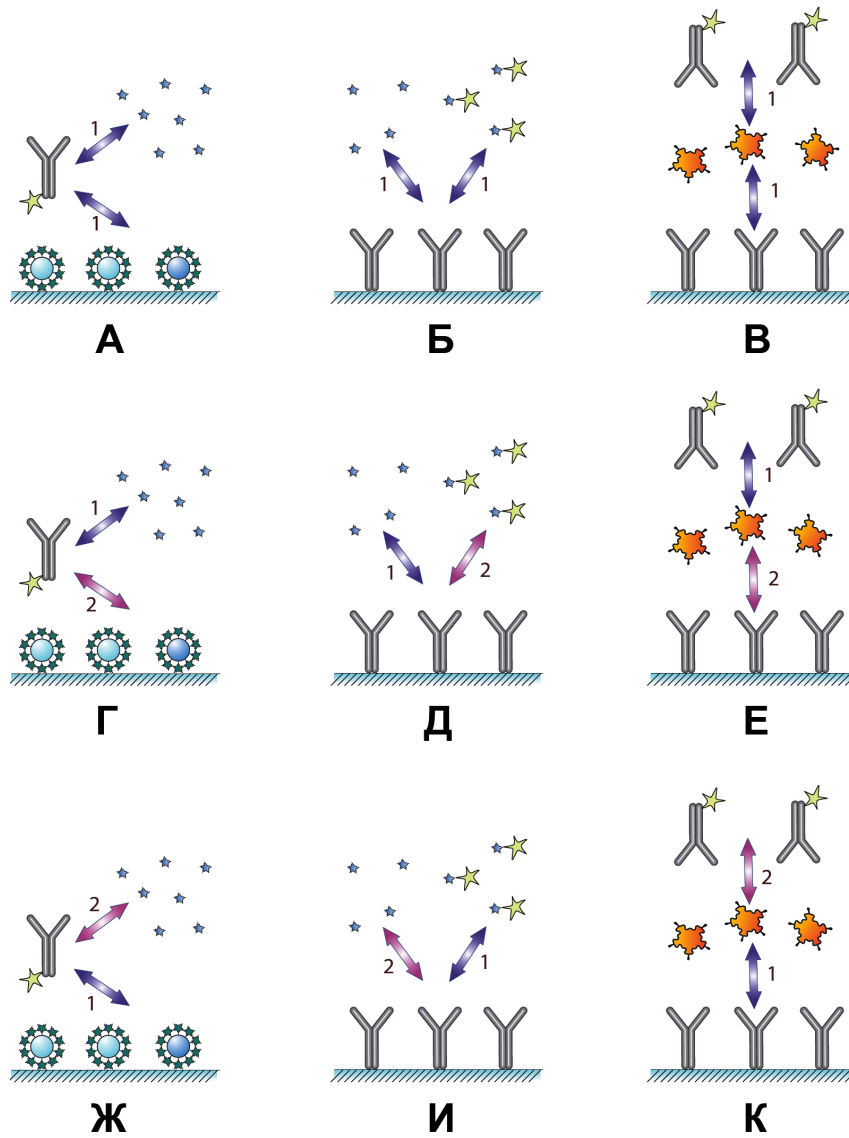


Рис. 2. Классификация форматов иммуноанализа.

Изображения реагентов – такие же, как на рис. 1. Буквенные обозначения поясняются в тексте статьи. Цифры 1 и 2 обозначают порядок добавления реагентов.

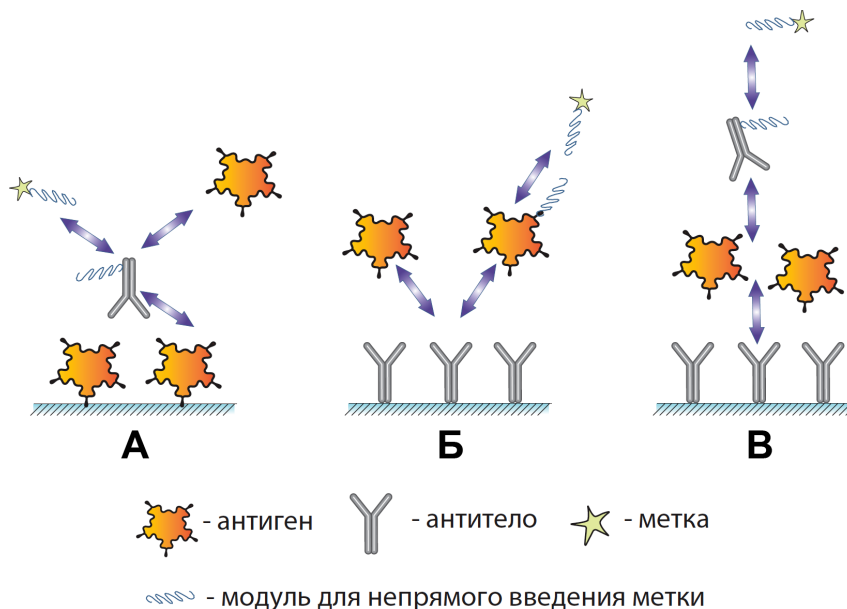


Рис. 3. Форматы иммуноанализа с непрямым введением метки.

- А – конкурентный анализ с мечеными антителами;
- Б – конкурентный анализ с меченым антигеном;
- В – «сэндвич»-анализ.

Отметим, что «сэндвич»-анализ удастся реализовать и для моно-валентных антигенов. Соответствующие разработки суммированы в недавнем обзоре [25]. Однако для связывания антител с комплексами антитело – (низкомолекулярное соединение) требуется получение специальных реагентов. Эта трудоемкая работа ограничивает применение таких форматов анализа, хотя в отдельных случаях они демонстрируют весьма высокую чувствительность [26].

Каждую из аналитических схем, описанных выше, можно подразделить на две группы по способу введения метки. Возможно:

- прямое мечение антитела или антигена через химическую ковалентную связь или путем адсорбции;
- введение метки в результате дополнительной реакции (в отдельной стадии анализа или совмещенной с другими стадиями): посредством взаимодействия специфических антител с антивидами или использования специальных модулей – высокоаффинных пар реагентов, например, биотин – (стрепт)авидин, барназа – барстар (рис. 3).

Метка может регистрироваться по окончании анализа двумя способами, подразделяющими каждый из рассмотренных выше форматов еще на две группы:

- измерение метки, иммобилизованной на носителе в составе иммунного комплекса,
- либо измерение несвязавшейся метки.

Рассмотренная выше классификация позволяет выделить 36 ( $3 \times 3 \times 2 \times 2$ ) потенциально реализуемых форматов гетерогенного иммуноанализа, описываемых по единой схеме.

Отдельные группы формируют гомогенные методы анализа, в которых носитель не участвует и разделения реагентов не происходит. Детекция связывания антитела и антигена в гомогенном анализе основана на различных косвенных параметрах:

- изменение скорости вращения меченого антигена после взаимодействия с антителом (поляризационный флуороиммуноанализ) [27, 28];
- модуляция флуоресценции маркеров при формировании иммунных комплексов – FRET-анализ, «quenchbodies», «flashbodies» [29–32];
- уменьшение активности ферментной метки из-за затруднений доступа к субстрату после иммунного комплексообразования [33, 34];
- модулируемая антителами сборка олигомерных ферментов, сопровождающаяся изменением их каталитической активности [35];
- изменение оптических, акустических и других параметров среды вследствие образования иммунных комплексов и пр. [36–38].

Кроме того, возможны так называемые псевдогомогенные форматы анализа, в которых к иммунореагенту присоединен носитель, но иммунохимические взаимодействия проводятся в объеме раствора, и лишь затем воздействие на носитель инициирует разделение связавшихся с ним иммунных комплексов и остальных компонентов реакционной среды. Наиболее распространены варианты, в которых в качестве диспергированного носителя используются магнитные частицы, отделяемые по завершении анализа внешним магнитным полем [39, 40]. Описаны также аналитические системы с использованием в качестве носителей заряженных полимеров, осаждаемых противоионами, термочувствительных полимеров и других соединений [41–44].

Также отдельно надо упомянуть системы, в которых антитела являются аналитами, а антигены выступают в качестве рецепторных молекул. К этому типу относятся методы серодиагностики – определения специфических иммуноглобулинов (антител) в крови, используемого для диагностики инфекционных и аллергических заболеваний [45]. В таких системах, как правило, антиген иммобилизуется на твер-



дой поверхности, а метка конъюгируется с реагентами, связывающими иммуноглобулины: антивидовыми антителами, белком А из *Staphylococcus aureus*, белком G из *Streptococcus* spp. или другими реагентами [46, 47]. Соответственно, если в тестируемой пробе присутствуют специфические иммуноглобулины, то на носителе формируются детектируемые комплексы состава (антиген – специфические иммуноглобулины – меченый иммуноглобулин–связывающий белок).

Безмаркерные аналитические системы, а также системы с прямой регистрацией формируемого комплекса по включению в его состав метки предполагают потенциально существенно более простой порядок взаимодействий, теоретическое описание которых в первом приближении сводится к бимолекулярной реакции антиген + антитело = комплекс. Именно по такому принципу построены пьезокварцевые иммуносенсоры, иммуносенсоры на основе регистрации поверхностного плазмонного резонанса и ряд других биосенсоров [48–52].

Как видим, рассматривая математические модели биоаналитических систем, необходимо в первую очередь принимать во внимание, какие детектируемые комплексы и в каком порядке в них образуются.

### III. МЕТКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОАНАЛИЗЕ

В истории развития биоаналитических систем можно выделить ключевые периоды, в которые основной прогресс был связан с началом использования тех или иных меток для выявления специфических комплексов. Так, в 1960 г. R.S. Yalow и S.A. Berson предложили применять для детекции иммунных комплексов радиоактивный изотоп  $^{131}\text{I}$  [53]. Радиоиммуноанализ (РИА) обеспечил существенный выигрыш в чувствительности, повысил точность определения. Универсальность данного подхода позволила применять его для детекции самых разнообразных соединений. Значимость этой разработки была отмечена Нобелевской премией 1977 г. в области физиологии и медицины, присужденной R.S. Yalow.

Несмотря на несомненные достоинства РИА, его применение во многом ограничивалось сложностью работы с изотопами. Поэтому в качестве альтернативных меток стали активно продвигаться в практику ферменты. Методология мечения антител ферментами и регистрации их активности имела хороший задел в иммуногистохимических разработках. Однако потребовался ряд решений, обеспечивающих высокий выход конъюгатов иммунореагентов с ферментами-метками, ста-

бильность их свойств [54–57]. В результате уже в 1980-е годы наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) стали широко производиться, а для проведения анализа появились полуавтоматические и автоматические приборы. Примерно в то же время были успешно коммерциализованы разработки поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) и предложены автоматические системы для высокопроизводительного тестирования [58].

К 1990-м годам относится резкое расширение производства тест-систем для внелабораторной диагностики, основанных на принципе иммунохроматографического анализа (ИХА). Проведение анализа с их помощью сводится к контакту пробы и тест-полоски с предварительно нанесенными на нее иммунореагентами. Движение жидкости под действием капиллярных сил вдоль тест-полоски инициирует все необходимые аналитические реакции и приводит к окрашиванию ее определенных зон. Основные маркеры в иммунохроматографии – золотые наночастицы и окрашенные латексные частицы [59, 60].

Активный интерес к нанотехнологиям в начале XXI века привел к рассмотрению в качестве меток самых разнообразных наночастиц, предлагаемых к использованию как в традиционных форматах анализа (как замена общепринятых меток), так и в различных новых биоаналитических и биосенсорных системах. Описано иммуноаналитическое применение наночастиц различных классов – коллоидное золото разной формы, коллоидное серебро, углеродные наночастицы, магнитные наночастицы, квантовые точки, преобразующие флуорофоры, инфракрасные маркеры, липосомы, кремниевые наночастицы и др. [61, 62]. Рассмотрение новой метки, как правило, сопровождается сравнением аналитических характеристик, достигаемых с ее использованием и в традиционном анализе. Однако массовые методические решения обновляются сравнительно медленно – далеко не каждое описанное в литературе улучшение чувствительности становится основанием для перевооружения практической аналитики.

Разнообразие биоаналитических маркеров в первом приближении суммирует перечень из работы А. Zelenakova и соавт. [63]:

- нерастворимые частицы (например, эритроциты, латексные гранулы, частицы графита, золи металлов и красителей (например, золото, Liminous Red G));
- радионуклиды (например,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ );
- ферменты (например, пероксидаза из корней хрена, щелочная фосфатаза);
- простетические группы;
- модуляторы ферментов;

- субстраты ферментов;
- липосомы;
- бактериофаги;
- флуоресцентные красители;
- хемилюминесцентные и биолюминесцентные вещества;
- вещества, рассеивающие электроны.

Это разнообразие обуславливает необходимость критериев, позволяющих сделать выводы о конкурентном потенциале нового маркера до или вместо его экспериментальной оценки. Такие критерии суммируют собственные характеристики маркера и не связаны с особенностями формата анализа и детектируемого соединения. Т.е. соответствующую паспортизацию маркеров можно провести до начала их использования в разработке аналитических систем, тем самым существенно снизив трудоемкость исследований.

По нашему мнению, при оценке возможностей того или иного аналитического маркера должны учитываться следующие параметры:

- предел детекции маркера (из определенного объема среды или с определенной площади носителя);
- максимальное количество единиц (молекул) маркера, которое может быть присоединено к иммунореагенту без ухудшения его иммунохимических свойств;
- соотношение детектируемого сигнала для маркера в свободном и в связанном виде (в том числе степень ослабления сигнала в аналитической системе).

Эти три параметра определяют пересчетные множители, трансформирующие характеристики маркеров в свойства аналитической системы, и поэтому крайне важны для количественных описаний.

Однако существует и ряд других важных критериев, относящихся к практическим аспектам применения маркеров и способных забраковать маркеры, потенциально перспективные исходя из их собственных характеристик. Эти критерии включают [60]:

- стоимость маркера, его доступность в пригодном для применения виде;
- методическую простоту конъюгирования маркера с иммунореагентами;
- стабильность маркера при хранении, воспроизводимость регистрируемых сигналов;
- возможность количественной регистрации маркера с использованием доступного и недорогого (серийно производимого) приборного обеспечения;
- отсутствие влияния компонентов тестируемых проб на сигнал, генерируемый маркером.

Следует отметить, что современные разработки биоаналитических систем не ограничиваются применением меток с низкими пределами детекции. Проведение анализа предусматривает дополнительные амплификационные процессы, увеличивающие количество молекул (частиц) маркера, связанных с иммунным комплексом или используемых для конечной регистрации сигнала [64–66]. Среди таких решений особый интерес представляет интеграция селективного выявления аналита с помощью антител и последующего усиления сигнала от олигонуклеотидного маркера с использованием стандартных методик проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод иммуно-ПЦР позволяет радикально снизить пределы детекции иммуноанализа и выявлять минимальные количества – десятки–сотни – молекул [67, 68]. Активно развиваются и суперчувствительные аналитические системы, основанные на регистрации единичных иммунных комплексов, – правда, на сегодняшний день требующие довольно сложного приборного обеспечения [69, 70].

#### **IV. КЛЮЧЕВЫЕ ПОНЯТИЯ И ПРОЦЕССЫ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

При моделировании биоаналитических систем, помимо схемы анализа, необходимо учитывать ряд факторов:

- рассматриваются ли равновесные или неравновесные условия взаимодействия;
- считаются ли реакции образования специфических комплексов обратимыми или необратимыми;
- учитываются ли диффузионно-зависимые процессы;
- отражает ли модель возможности би- и поливалентных взаимодействий в формирующихся комплексах и др.

Хотя любая биоаналитическая система основана на взаимодействии определяемого соединения (аналита) с биомолекулой, специфически связывающей аналит (рецептором), а ее модель должна предусматривать описание кинетических закономерностей данной реакции, в зависимости от условий проведения анализа будут оправданы разные ответы на указанные выше вопросы и, соответственно, выбор разного теоретического аппарата для описания биоаналитических систем.

##### **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ДИФFUЗИИ**

Как отмечалось выше, большинство современных биоаналитических систем предусматривает использование носителя для формирования детектируемых иммунных комплексов. Поэтому теоретическое опи-

сание анализа не может ограничиваться решением сравнительно более простых задач взаимодействия в растворе. Необходим учет диффузионного приближения одного из реагентов к поверхности, на которой находится другой реагент, и соответствующей неоднородности распределения концентраций реагентов в объеме. Следовательно, предлагаемая модель должна включать или рассмотрение диффузионно-зависимых процессов в явном виде, или обоснованные рекомендации об использовании тех или иных упрощающих предположений с учетом особенностей данной аналитической системы.

Лимитированные диффузией реакции характерны именно для гетерогенных систем [71] и/или для систем, в которых взаимодействие протекает в вязкой среде (например, реакция преципитации в геле) [3]. Следует признать, однако, что лишь небольшая часть предлагаемых математических моделей биоаналитических систем рассматривает диффузионные процессы. Общие вопросы диффузионно-зависимых процессов в анализе рассматривались в классических работах М. Stenberg и Н. Nygren [72–74] и затем, за немногими исключениями [75–77], сформулированные закономерности не дополнялись. Преимущественно же авторы моделей вводят для иммобилизованных реагентов условные концентрации в объеме и обсуждают классические закономерности гомогенных реакций.

Изменение концентрации диффундирующего компонента ( $C$ ) с течением времени в точке пространства с координатами  $x, y, z$  определяется вторым законом Фика:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) = D \operatorname{div} \operatorname{grad} C = D \nabla^2 C. \quad (1)$$

Величина  $D$  (коэффициент диффузии) определяет количество вещества, проникающего через единичную поверхность за единицу времени [78, 79]. Данная величина измеряется в  $\text{м}^2/\text{с}$  и зависит от свойств как растворителя, так и растворенного вещества. В приближении броуновской сферической частицы коэффициент диффузии выражается как:

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu r}, \quad (2)$$

где  $k$  – постоянная Больцмана;  $T$  – температура среды;  $\mu$  – коэффициент вязкости;  $r$  – радиус частицы.

При моделировании аналитических систем второй закон Фика применяется не только для описания скорости движения реагента к рецепторной поверхности [71], но и для характеристики распределения реагирующего вещества в потоке в проточных системах. Так, S. Qian

и Н.Н. Вау [80] использовали второй закон Фика для учета диффузии реагентов в потоке жидкой пробы при математическом описании иммунохроматографии в «сэндвич»-формате. Согласно предложенной ими модели, изменение концентрации маркера (коллоидного золота) в точке с координатой  $x$  (направление оси  $x$  совпадает с направлением движения потока жидкости) описывается следующим образом:

$$\frac{\partial [P]}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} - U \frac{\partial [P]}{\partial x} - (F_{PA} + F_{RPA}^2), \quad (3)$$

где  $A$  – аналит;  $P$  – центры связывания аналита на маркере;  $R$  – рецептор в аналитической зоне;  $PA$  – комплекс аналита с маркером;  $RPA$  – комплекс аналита с маркером и рецептором в аналитической зоне;  $x$  – координата положения на тест-полоске;  $F_n$  – скорости образования  $n$ -ого комплекса;  $U$  – скорость потока жидкости;  $D_p$  – коэффициент диффузии маркера.

Выражение вида  $U \cdot d[\text{концентрация реагента}]/dx$  в уравнении (3) отражает изменение концентрации  $P$  в точке с координатой  $x$ , обусловленное потоком жидкости, который смещает положение всех растворенных молекул и частиц. Выражение вида  $D_p \cdot d^2[\text{концентрация реагента}]/dx^2$  отражает изменение концентрации  $P$  в точке с координатой  $x$ , обусловленное диффузионными процессами и описываемое вторым законом Фика.

Модель S. Qian и Н.Н. Вау предполагает, что в направлениях  $y$  и  $z$  свойства аналитической системы не отличаются, вследствие чего используется одномерная форма уравнения (1). Данное приближение вполне оправдано с учетом малых поперечных размеров пор в рабочих мембранах иммунохроматографических тестов: 5–15 мкм.

В последние годы опубликованы работы, рассматривающие различные аспекты диффузионно-зависимых процессов в биоаналитических системах: влияние вращательной диффузии на транспорт антигенов [81], применение фрактальных моделей для описания микрогетерогенных процессов на биосенсорных поверхностях [82], выбор геометрии микрозон связывания, минимизирующей диффузионно-зависимые процессы [83, 84], конструирование микрофлюидных систем с быстрым достижением химического равновесия [85], элиминацию диффузии в псевдогомогенных системах с использованием наночастиц [86] и полимеров [87] и др.

В отличие от проточных биоаналитических систем, к которым относятся иммунохроматографические тесты, большинство других форматов анализа предусматривает режимы проведения, в ходе которых реагенты успевают перераспределиться в объеме. При инкубациях реагентов в течение нескольких десятков минут в миллилитровых

и субмиллилитровых объемах диффузионными процессами можно пренебречь. В системах же с короткими инкубациями для ускорения диффузионных процессов в приповерхностном слое предлагаются различные специальные решения – перемешивание, обработка ультразвуком и другие воздействия [88–93].

#### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ

Количественное описание химических превращений в аналитических системах, не лимитированных диффузией, опирается на основной постулат химической кинетики – закон действующих масс. В простейшем случае моновалентного связывания аналит – рецептор ( $A + R \leftrightarrow AR$ ) закон действующих масс дает дифференциальное уравнение для скоростей изменения концентраций реагентов и комплекса [94]:

$$\frac{\partial[AR]}{\partial t} = \frac{-\partial[A]}{\partial t} = \frac{-\partial[R]}{\partial t} = k_a[A][R] - k_d[AR], \quad (4)$$

где  $k_a$  и  $k_d$  – кинетическая константа ассоциации и кинетическая константа диссоциации комплекса AR, соответственно.

С учетом соотношений:  $[A] + [AR] = [A]_0$  и  $[R] + [AR] = [R]_0$ , где индекс 0 обозначает начальные концентрации реагентов, уравнение (4) приводится к виду с одной переменной  $[AR]$ :

$$\frac{\partial[AR]}{\partial t} = k_a([A]_0 - [AR])([R]_0 - [AR]) - k_d[AR], \quad (5)$$

Уравнение (5) имеет строгое аналитическое решение, которым является функция:

$$[AR] = \frac{a}{b - \frac{\sqrt{b^2 - 2a}(1 + e^{k_a t \sqrt{b^2 - 2a}})}{(1 - e^{k_a t \sqrt{b^2 - 2a}})}}, \quad (6)$$

где  $a = 2[A]_0[R]_0$ ,  $b = [A]_0 + [R]_0 + k_d/k_a$ .

В описанных в литературе моделях это точное решение практически не применяется. Вместо него используются приближенные решения. Как правило, при описании кинетики формирования аффинных комплексов принимаются два основных приближения:

- равновесные условия взаимодействия
- и необратимость реакции связывания.

Состояние равновесия задается условием равенства нулю всех скоростей реакций, откуда вытекает соотношение:

$$\frac{[AR]}{([A]_0 - [AR])([R]_0 - [AR])} = \frac{k_a}{k_d} = Ka, \quad (7)$$

где  $Ka$  – равновесная константа ассоциации, или константа аффинности.



Для экспрессных биоаналитических методов с инкубацией реагентов в течение нескольких минут такое приближение является весьма грубым, хотя и применяется на практике [80, 95, 96]. При характеристике кинетических систем более оправдано приближение необратимой реакции, поскольку рецепторные молекулы, применяемые в биоанализе, как правило, характеризуются высоким сродством к определяемому соединению. Например, антитела редко имеют кинетическую константу диссоциации больше  $10^{-4} \text{ с}^{-1}$  [97]. При таких значениях за 10 мин диссоциирует менее 6% образовавшегося иммунного комплекса, поэтому процессом диссоциации в кинетической аналитической системе можно пренебречь.

Образование продукта в бимолекулярной необратимой реакции  $A + R \rightarrow AR$  описывается уравнением [98]:

$$[AR] = \frac{[A_0][R_0](e^{tk_a([A_0]-[R_0])}-1)}{[A_0]e^{tk_a([A_0]-[R_0])}-[R_0]} \quad (8)$$

Отметим, что уравнение (8) является предельным случаем уравнения (6) при  $k_d \rightarrow 0$ .

#### ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДЕЛЫ ПАРАМЕТРОВ РЕАКЦИИ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО

Традиционно отмечаемое достоинство антител – высокая аффинность комплексообразования с антигенами, определяющая возможность выявления антигенов в крайне низких концентрациях. Однако аффинность иммунных комплексов ограничена природой индукции иммунного ответа, что накладывает ограничения и на предел детекции иммуноаналитических систем.

Максимальная константа скорости ассоциации ( $k_a$ ) для взаимодействия антител с белковыми антигенами определяется скоростью диффузии белковых молекул в растворе и является величиной порядка  $10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$  [99]. Константа скорости диссоциации комплекса ( $k_d$ ) может возрастать за счет отбора антител *in vivo* [100, 101], но лишь до определенного предела. Согласно гипотезе «affinity ceiling» [101–103], для клонов, секретирующих высокоаффинные антитела, их дальнейший отбор под действием антигена происходит менее эффективно. Это связано с тем, что для антител с  $k_d = 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  время полужизни комплекса антигена с В-клеточным рецептором составляет почти 2 часа и становится существенно больше, чем время эндоцитоза комплекса антитела с В-клеточным рецептором (около 8,5 мин). Дальнейшее увеличение времени полужизни комплекса уже не способствует пролиферации В-клеток. В связи с этим при вторичном иммунном ответе для антител класса IgG, специфичных к белковым



антигенам, характерны значения равновесной константы ассоциации в диапазоне  $10^7$ – $10^{10}$  М<sup>-1</sup>.

Описанные выше ограничения для отбора высокоаффинных клонов не исключают возможности того, что для некоторых антигенов достигается существенно более высокая степень комплементарности с антиген-связывающим сайтом антитела и, соответственно, более высокая константа связывания. Недиссоциирующие комплексы антиген–антитело описаны в работе [104], в которой в результате целенаправленного дизайна антител получены антитела с бесконечной аффинностью к хелатному комплексу (S)-бензил-этилендиамин-тетрауксусная кислота с индием. Аналогичные эффекты выявлены для взаимодействия между антигеном и комплексом антитело–ион металла [105].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Хотя, как отмечалось выше, аналитическое решение системы уравнений в общем виде является наиболее эффективным средством теоретического описания биоаналитических систем, при характеристике анализа важно знать количественные параметры взаимодействия аналит–рецептор – прежде всего, кинетические и равновесную константу реакции. С учетом этих параметров можно оценить корректность принимаемых при моделировании положений, а при необходимости – прибегнуть к численному моделированию.

Методы измерения констант образования/диссоциации комплексов биомолекул весьма разнообразны [106]. Так, для этих целей активно использовались равновесный диализ, элюция реагентов с аффинных колонок [107]. Разработан теоретический аппарат, описывающий расчет констант связывания в экспериментах по капиллярному электрофорезу [108–110]. Методы, основанные на регистрации флуоресценции или поляризации флуоресценции, позволяют быстро охарактеризовать лиганд-рецепторное взаимодействие в растворе, не прибегая к дополнительным стадиям измерений [111–113]. Крайне популярны подходы, основанные на применении для измерения констант ИФА – т.е. аналитической системы, которая является также предметом разработки или вспомогательным средством характеристики реагентов при разработке. Классические рекомендации по этому вопросу предложены в работах В. Friquet, L. Djavadi-Ohanianse и соавт. [114–116]. Особенности обработки экспериментальных данных и выбора наиболее корректных расчетных процедур обсуждаются в ряде более поздних работ [117–121].

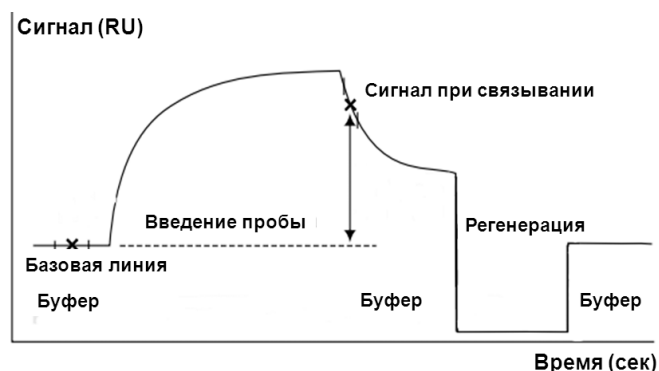


Рис. 4. Общий вид сенсограммы, регистрируемой в системе Biacore.

Тем не менее, несмотря на это разнообразие, в качестве общепринятого «золотого стандарта» при измерении и сравнительной оценке констант межмолекулярных взаимодействий в настоящее время рассматривается биосенсорный анализ, основанный на регистрации поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Рассмотрим подробно принцип соответствующих измерений и обработки данных на примере применения биосенсора Biacore – наиболее распространенной из оптических сенсорных систем [122].

Экспериментальная характеристика межмолекулярных взаимодействий в системе Biacore включает:

- 1) иммобилизацию одного из компонентов взаимодействующей пары на поверхности чипа;
- 2) пропускание над поверхностью чипа раствора, содержащего второй компонент взаимодействующей пары, с одновременной регистрацией взаимодействия;
- 3) прекращение поступления в ячейку второго компонента пары и регистрацию диссоциации образовавшегося комплекса;
- 4) регенерацию поверхности чипа растворами, разрушающими лиганд-рецепторный комплекс, но не повреждающими иммобилизованный компонент;
- 5) повторение стадий 2–4 с другими препаратами, реагирующими с иммобилизованным компонентом.

Зависимость отклика прибора (величины ППР) от времени называется сенсограммой [123]. Ее принципиальный общий вид представлен на рис. 4.

Сенсограмма содержит все данные, необходимые для вычисления кинетических и равновесных параметров образования специфичес-

кого комплекса [124–127]. Простейшая модель, которая позволяет извлечь значения констант из сенсограммы, исходит из предположения о равновесных условиях и исключает из рассмотрения диффузионно-зависимые процессы [125–127].

#### Стадия ассоциации

С учетом равновесного приближения стадия ассоциации описывается уравнением (4), в котором производные концентраций по времени приравниваются к нулю:

$$k_a[A][R] = k_d[AR]. \quad (9)$$

Поскольку концентрация активных рецепторных молекул на сенсорной поверхности ( $[R]$ ) обычно не известна, вместо нее удобнее рассматривать степень заполнения поверхности ( $\theta$ ). Величина  $\theta$  – это соотношение  $Ru/Ru_{\max}$ , где  $Ru$  – сигнал прибора (за вычетом фона),  $Ru_{\max}$  – максимальное значение сигнала (за вычетом фона) при связывании всех рецепторных молекул на поверхности. Концентрации свободных и связанных рецепторных молекул можно выразить через начальную концентрацию рецептора  $[R]_0$  и  $\theta$ :  $[R] = (1-\theta)[R]_0$  и  $[AR] = \theta[R]_0$  [128].

Поскольку на стадии ассоциации аналит постоянно поступает в реакционную зону с потоком жидкости и, согласно принятым предположениям, сразу равномерно перемешивается, то его концентрацию над сенсорной поверхностью можно считать постоянной, то есть  $[A] \approx [A]_0$ . Концентрированием аналита вблизи поверхности из-за специфического связывания также можно пренебречь. Так как количество аналита на поверхности много меньше его количества в объеме, можно считать, что усредненная концентрация вследствие взаимодействия с рецептором меняется слабо. Чем выше скорость потока жидкости, тем точнее будет выполняться данное приближение. Поэтому уравнение (9) можно переписать следующим образом:

$$k_a[A]_0(1 - \theta) = k_d\theta, \quad (10)$$

$$K_a[A]_0\left(1 - \frac{Ru}{Ru_{\max}}\right) = \frac{Ru}{Ru_{\max}}. \quad (11)$$

Уравнение (11) описывает зависимость сигнала от равновесной константы ассоциации и концентрации аналита, поступающего в ячейку. С учетом допущения о равновесном состоянии в уравнение следует подставлять величины  $Ru$ , наиболее близкие к равновесным (верхнее плато участка ассоциации на сенсограмме). Для расчета константы взаимодействия можно воспользоваться растворами, содержащими известные концентрации аналита.

### Стадия диссоциации

Диссоциация иммунного комплекса – мономолекулярная реакция. Поэтому ее скорость зависит только от кинетической константы диссоциации. В проточной системе диссоциацию можно считать необратимой, так как продукты диссоциации вымываются из реакционной зоны, а новые комплексы не образуются из-за отсутствия аналита в промывающей жидкости. Поэтому зависимость доли распавшегося комплекса ( $D$ ) от времени диссоциации ( $t$ ) определяется кинетическим уравнением необратимой мономолекулярной реакции:

$$D = 1 - e^{-kat} \quad (12)$$

Доля распавшегося комплекса рассчитывается как  $D = 1 - Ru/Ru_0$ , где  $Ru_0$  – сигнал (минус фон) в момент начала диссоциации,  $Ru$  – сигнал (минус фон) в момент времени  $t$ .

### БИВАЛЕНТНОСТЬ АНТИТЕЛ И ЕЕ РОЛЬ В ИММУНОАНАЛИЗЕ

Важной особенностью антител, отличающей их от других биорецепторных молекул, является множественность сайтов связывания аналита. У иммуноглобулинов класса G, наиболее часто используемых в анализе, таких сайтов два, при работе с иммуноглобулинами класса M следует принимать во внимание наличие десяти связывающих сайтов\*. Если на поверхности антигена на достаточном расстоянии друг от друга имеются идентичные эпитопы, то становится возможным образование не одной, а двух связей антитела с антигеном. К таким поливалентным антигенам относятся вирусные частицы, бактериальные клетки, биополимеры с вырожденной структурой, некоторые олигомерные белки, а также синтетические конъюгаты антиген–носитель.

Возможность бивалентного взаимодействия антитело–антиген вызывает ряд последствий, важных для оценки функционирования биоаналитических систем:

- образование при взаимодействии с поливалентными антигенами смеси иммунных комплексов разного состава и аффинности;
- резкое снижение вероятности диссоциации иммунных комплексов после бивалентного связывания антител.

---

\* Моновалентны фрагментированные антитела некоторых животных (так называемые panobodies), рекомбинантные препараты антител, в которые включен лишь один антитело-связывающий сайт, и специально получаемые фрагменты антител.

Отметим, что в системах конкурентного иммуноанализа поливалентное взаимодействие антител со стандартным препаратом антигена (обычно представленным в виде синтетического конъюгата аналит–носитель) ухудшает чувствительность детекции, т.к. комплексы с моновалентным антигеном пробы менее аффинны, чем с поливалентным антигеном. Поэтому «ухудшение» стандартного антигена посредством снижения содержания в нем аналита положительно сказывается на чувствительности анализа [129–131].

Различные аспекты описания поливалентных взаимодействий в биоаналитических системах рассмотрены в работах [132–140]. Так, L.D. Shiau [141] был проведен теоретический анализ образования иммунных комплексов в системе, состоящей из двух типов моноклональных антител и бивалентного антигена с двумя идентичными эпитопами. Автор не учитывал возможности формирования циклических комплексов и эффекта кооперативности и изучал лишь среднюю молекулярную массу линейных комплексов антиген–антитело. В работе R.J. Joshi [142] для моделирования зависимости образования комплексов разного состава от аффинности антител применена механико-статистическая теория. При этом рассматривались две системы: взаимодействие моноклональных антител и антигена известной валентности с идентичными детерминантами и более сложный случай, когда сайты связывания антител и антигенов различались по свойствам. Теоретическое изучение влияния кластеризации рецепторов в различных конфигурациях на кинетические параметры иммунного взаимодействия было представлено J.H. van Orpheusden и соавт. [143]. W.S. Flavacek и соавт. [144] предложили модель мультивалентного лиганд–рецепторного связывания, учитывающую экранирование лигандом нескольких рецепторов (характерное, например, для вирусов и белковых поливалентных антигенов), и изучили влияние этого фактора на кинетические и равновесные параметры реакции. Свойства аналитических систем, в которых используются нагруженные антигеном липосомы, рассмотрены O.D. Hendrickson и соавт. [145].

Попытка учета поливалентных взаимодействий без значительного усложнения техники расчетов предпринята авторами работы [11], которые применили в своей модели так называемый «узловой» анализ (NODE). Смысл метода заключается в рассмотрении кинетики каждой реакции сложного многокомпонентного процесса в отдельном «узле» за малый промежуток времени и построении итерационного процесса, охватывающего всё время проведения реакции. При введении дополнительных реакций и, соответственно, «узлов» расчетов модель может быть усложнена.

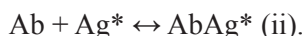
В целом авторы работ по исследованию бивалентных иммунных взаимодействий отмечают необходимость корректного учета отличий аффинности элементарного взаимодействия (антиген-связывающий сайт антитела – эпитоп антигена) и средней аффинности иммунных комплексов, отражающей поли- и моновалентные взаимодействия для данной пары реагентов.

Равновесные константы связывания бивалентного связывания антител могут на два порядка превосходить константы моновалентного связывания [146, 147]. Это соотношение констант зависит от особенностей как антитела, так и антигена, отражая механизм взаимодействия активного центра антитела со своим эпитопом, подвижность сегментов иммуноглобулиновой молекулы, расстояния между детерминантами и их ориентацию на поверхности поливалентного антигена. D.M. Crothers и H. Metzger [148] провели расчет значений констант связывания для двух активных центров антител на основании экспериментально определенных значений моновалентного взаимодействия.

## V. МОДЕЛИ РАЗЛИЧНЫХ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ФОРМАТОВ

### ИММУНОАНАЛИЗ В КОНКУРЕНТНОМ ФОРМАТЕ

Принцип классического конкурентного иммуноанализа с меченым антигеном (см. рис. 1, Б) заключается в одновременном взаимодействии антител (Ab) с антигеном (Ag) и его меченым аналогом (Ag\*) [149]. Соответственно, в системе протекают две реакции:



Реакции характеризуются кинетическими константами ассоциации  $k_{a1}$  и  $k_{a2}$  и кинетическими константами диссоциации  $k_{d1}$  и  $k_{d2}$  соответственно. В простейшем случае предполагается, что все центры связывания у антител идентичны. Все превращения в этой системе описывает схема, представленная на рис. 5.

Установим для этой системы градуировочную кривую – зависимость детектируемого сигнала (количества связанной метки) от содержания аналита в тестируемой пробе. Рассмотрение этой функции позволит теоретически исследовать влияние различных параметров на аналитические характеристики метода.

На основании закона действующих масс можно записать систему дифференциальных уравнений:

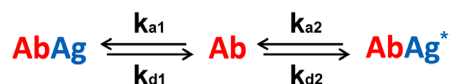


Рис. 5. Схема реакций в конкурентном иммуноанализе с меченым антигеном (см. пояснения в тексте).

$$\frac{\partial[\text{AbAg}]}{\partial t} = \frac{-\partial[\text{Ag}]}{\partial t} = k_{a1}[\text{Ab}][\text{Ag}] - k_{d1}[\text{AbAg}], \quad (13)$$

$$\frac{\partial[\text{AbAg}^*]}{\partial t} = \frac{-\partial[\text{Ag}^*]}{\partial t} = k_{a2}[\text{Ab}][\text{Ag}^*] - k_{d2}[\text{AbAg}^*], \quad (14)$$

$$\frac{\partial[\text{Ab}]}{\partial t} = \frac{\partial[\text{Ag}^*]}{\partial t} + \frac{\partial[\text{Ag}]}{\partial t}. \quad (15)$$

Систему следует дополнить уравнениями, выражающими закон сохранения массы:

$$[\text{Ag}]_0 = [\text{Ag}] + [\text{AbAg}], \quad (16)$$

$$[\text{Ag}^*]_0 = [\text{Ag}^*] + [\text{AbAg}^*], \quad (17)$$

$$[\text{Ab}]_0 = [\text{Ab}] + [\text{AbAg}] + [\text{AbAg}^*]. \quad (18)$$

Индекс 0 здесь и далее обозначает начальные концентрации реагирующих веществ. Отметим, что  $[\text{Ab}]$  – это общая концентрация центров связывания на антителах, так как антитела имеют несколько валентностей.

В литературе описано несколько вариантов аналитического решения системы уравнений (13)–(18). Как правило, для этого используется приближение равновесных условий [2, 149]. В таком случае вместо уравнений (13)–(15) получаем систему алгебраических уравнений:

$$k_{a1}[\text{Ab}][\text{Ag}] - k_{d1}[\text{AbAg}] = 0, \quad (19)$$

$$k_{a2}[\text{Ab}][\text{Ag}^*] - k_{d2}[\text{AbAg}^*] = 0. \quad (20)$$

Выразив уравнения (14)–(15) через равновесные константы ассоциации, имеем:

$$\frac{[\text{AbAg}]}{[\text{Ag}]} = \frac{k_{a1}}{k_{d1}} [\text{Ab}] = K_{a1}[\text{Ab}], \quad (21)$$

$$\frac{[\text{AbAg}^*]}{[\text{Ag}^*]} = \frac{k_{a2}}{k_{d2}} [\text{Ab}] = K_{a2}[\text{Ab}]. \quad (22)$$

В первых моделях конкурентного анализа для упрощения принималось, что аффинность антител к антигену и его меченому аналогу одинакова, т.е.  $K_{a1} = K_{a2} = K_a$  [2, 150]. В этом случае:

$$\frac{[AbAg]}{[Ag]} = \frac{[AbAg^*]}{[Ag^*]} = K_a [Ab]. \quad (23)$$

Выражение (23) означает, что при равенстве констант доля свободного меченого антигена равна доле свободного немеченого антигена, так как

$$\begin{aligned} \frac{[AbAg]}{[Ag]} + 1 &= \frac{[AbAg^*]}{[Ag^*]} + 1 = \frac{[AbAg] + [Ag]}{[Ag]} = \frac{[AbAg^*] + [Ag^*]}{[Ag^*]} = \\ &= \frac{[Ag]_0}{[Ag]} = \frac{[Ag^*]_0}{[Ag^*]} = \frac{1}{x}, \end{aligned} \quad (24)$$

где  $x$  – доля свободного антигена (меченого или немеченого).

Если доли свободных меченых и немеченых антигенов равны, то равны и доли связанных антигенов:

$$\frac{[AbAg]}{[Ag]_0} = \frac{[AbAg^*]}{[Ag^*]_0} = y. \quad (25)$$

Сложив уравнения (19) и (20), после преобразований получаем:

$$K_a [Ab] = \frac{[AbAg] + [AbAg^*]}{[Ag] + [Ag^*]}. \quad (26)$$

Учитывая, что  $[AbAg] = y[Ag]_0$ ;  $[AbAg^*] = y[Ag^*]_0$ ;  $[Ag] = (1-y)[Ag]_0$ ;  $[Ag^*] = (1-y)[Ag^*]_0$ ;  $[Ab] = [Ab]_0 - ([AbAg] + [AbAg^*]) = [Ab]_0 - y([Ag]_0 + [Ag^*]_0)$ , уравнение (26) можно переписать в виде:

$$K_a ([Ab]_0 - y([Ag]_0 + [Ag^*]_0)) = \frac{y}{1-y}. \quad (27)$$

Уравнение (27) можно встретить в литературе в различной форме, например, в работе [150] оно приведено к виду:

$$[Ag]_0 + [Ag^*]_0 = \frac{[Ab]_0}{y} - \frac{1}{K_a(1-y)}. \quad (28)$$

Фактически это – квадратное уравнение, которое связывает между собой долю связанного антигена, начальные концентрации центров связывания антител, меченого и немеченого антигена и константу взаимодействия (константу диссоциации иммунного комплекса):

$$\begin{aligned} &([Ag]_0 + [Ag^*]_0)y^2 - ([Ab]_0 + [Ag]_0 + [Ag^*]_0 + \\ &+ K_a)y + [Ab]_0 = 0. \end{aligned} \quad (29)$$

Решение квадратного уравнения (29) описывает в общем виде градуировочную кривую анализа:



$$y = \frac{[Ab]_0 + [Ag]_0 + [Ag^*]_0 + K_d}{2([Ag]_0 + [Ag^*]_0)} + \frac{\sqrt{([Ab]_0 + [Ag]_0 + [Ag^*]_0 + K_d)^2 - 4[Ab]_0([Ag]_0 + [Ag^*]_0)}}{2([Ag]_0 + [Ag^*]_0)}. \quad (30)$$

Позднее были рассмотрены модели конкурентного анализа для случая, когда аффинности антител по отношению к меченому и немеченому антигену различаются [22, 151, 152]. Такая система описывается уже кубическим уравнением, которое выводится из уравнений (16)–(22):

$$[Ab]^3 + a[Ab]^2 + b[Ab] + c = 0, \quad (31)$$

где

$$\begin{aligned} a &= K_{d1} + K_{d2} + [Ag]_0 + [Ag^*]_0 - [Ab]_0; \\ b &= K_{d2}([Ag]_0 - [Ab]_0) + K_{d1}([Ag^*]_0 - [Ab]_0) + K_{d2}K_{d1}; \\ c &= -K_{d2}K_{d1}[Ab]_0. \end{aligned}$$

Воспользовавшись тригонометрическими формулами, получим решение уравнения (31) в виде:

$$[Ab] = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3}\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3}, \quad (32)$$

$$\text{где } \theta = \arccos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}.$$

Установив  $[Ab]$ , можно написать формулы и для  $[AbAg]$  и  $[AbAg^*]$ :

$$[AbAg] = \frac{[Ag]_0(2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)}{3K_{d1} + (2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)}, \quad (33)$$

$$[AbAg^*] = \frac{[Ag^*]_0(2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)}{3K_{d2} + (2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)}. \quad (34)$$

Пример равновесных концентраций компонентов в системе конкурентного анализа, рассчитанных по уравнениям (32)–(34) с учетом (16)–(18), приведен на рис. 6. Наибольший интерес представляет зависимость  $[AbAg^*]$  от концентрации добавленного антигена, так как по сути это – градуировочная кривая анализа, анализируя форму которой, можно оценить потенциальные аналитические характеристики метода и влияние на них исходных параметров.

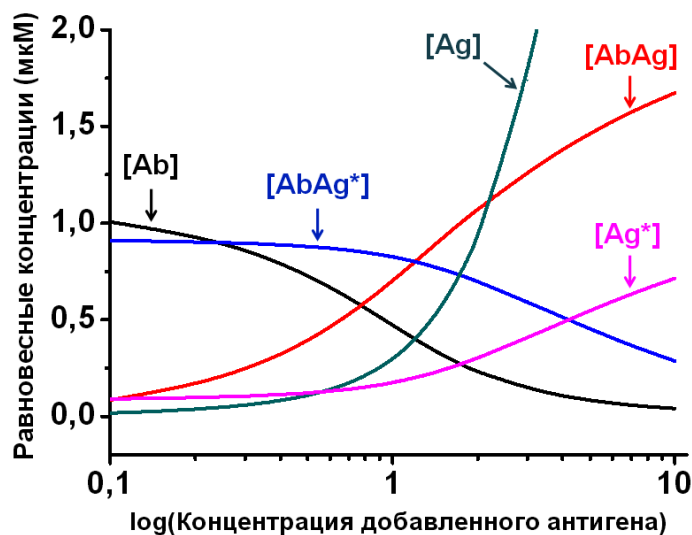


Рис. 6. Рассчитанные равновесные концентрации компонентов в системе конкурентного анализа. Параметры:  $[Ab]_0 = 2 \text{ мкМ}$ ;  $[Ag^*]_0 = 1 \text{ мкМ}$ ;  $K_{a1} = 5 \text{ мкМ}^{-1}$ ;  $K_{a2} = 10 \text{ мкМ}^{-1}$ .

В альтернативном формате конкурентного анализа иммобилизован антиген, а меченым реагентом являются антитела, которые одновременно взаимодействуют с иммобилизованным антигеном и свободным антигеном в растворе (конкурентом) – см. рис. 2, А. Однако кинетическая модель, представленная выше, подходит в равной степени и для описания этого варианта анализа. (Важно, что для обеих систем не рассматривается диффузия реагентов к поверхности.) Необходимо лишь изменить некоторые обозначения: Ab – меченые антитела, Ag\* – иммобилизованный антиген. Детектируется, как и в первом случае, комплекс AbAg\*.

Еще одним вариантом конкурентного анализа является метод последовательного насыщения, в котором антитела сначала взаимодействуют с определяемым (реакция (i)), а затем, после отмывки, – с меченым антигеном (реакция (ii)). D. Rodbard и соавт. [153] показали большую чувствительность такого анализа по сравнению с вариантом, основанным на одновременном проведении обеих стадий. Б.Б. Дзантиев и Д.К. Юрьев на основании анализа математической модели такой системы сформулировали рекомендации по улучшению характеристик анализа [154]. В методе последовательного насыщения параметры анализа определяются реакцией с определяемым антигеном.

Реакция с меченым антигеном играет вспомогательную роль, позволяя регистрировать количество свободных центров связывания. При достижении строгой пропорциональности  $[AbAg^*] = C^* [Ab]$  калибровочная кривая в нормированных координатах полностью совпала бы с кривой титрования антигена. В реальных условиях пропорциональность может нарушаться, и оптимизация условий анализа должна заключаться в подборе условий, при которых калибровочная зависимость максимально соответствует кривой титрования. В работе [154] также показано, что для выполнения этого требования время инкубации с меченым антигеном следует брать примерно равным  $0,1/k_{a1}$ . На примере ИФА инсулина продемонстрирована хорошая корреляция экспериментальных и расчетных данных.

Если для характеристики степени протекания реакции с определяемым антигеном ввести коэффициент  $n$  – долю центров связывания антител, заполненных антигеном после установления равновесия, то справедливы соотношения:

$$\begin{aligned} n[Ab]_0 &= [AbAg] = [Ab]_0 - [Ab], \\ n &= 1 - [Ab]/[Ab]_0. \end{aligned}$$

Используя выражения для равновесной константы ассоциации:  $[AbAg] = K_{a1}[Ab][Ag] = K_{a1}([Ab]_0 - [AbAg])([Ag]_0 - [AbAg])$ , можно записать:

$$n[Ab]_0 = K_{a1}([Ab]_0 - n[Ab]_0)([Ag]_0 - n[Ab]_0). \quad (35)$$

Отсюда получается выражение, связывающее долю заполненных центров связывания антител с константой ассоциации и начальными концентрациями реагентов:

$$[Ag]_0 = n[Ab]_0 + \left(\frac{n}{1+n}\right) \frac{1}{K_{a1}}. \quad (36)$$

Уравнения (30), (34), (36) описывают градуировочные кривые различных форматов конкурентного анализа и предсказывают поведение систем при варьировании концентраций реагентов и констант связывания, а также устанавливают теоретические пределы детекции, диапазоны определяемых концентраций и другие параметры анализа (см. раздел VI).

#### ИММУНОАНАЛИЗ В «СЭНДВИЧ»-ФОРМАТЕ

В «сэндвич»-иммуноанализе определяемый антиген имеет два эпитопа для связывания с двумя антителами, одни из которых иммобилизованы на поверхности, другие – связаны с меткой:  $Ab_1$  – первые антитела,  $Ab_2^*$  – меченые вторые антитела,  $Ag$  – определяемый антиген. Классический анализ с иммобилизацией первого антитела (РИА, ИФА) включает семь стадий:

- 1) иммобилизация антител  $Ab_1$ ;
- 2) отмывка для удаления несвязанных антител;
- 3) инкубация с антигеном  $Ag$  и прохождение реакции  $Ab_1 + Ag \leftrightarrow Ab_1Ag$  (**1A**) с константой ассоциации  $k_1$  и константой диссоциации  $k_2$ ;
- 4) отмывка для удаления несвязанного  $Ag$ ;
- 5) инкубация с мечеными антителами  $Ab_2^*$  и прохождение реакции  $Ab_1Ag + Ab_2^* \leftrightarrow Ab_1AgAb_2^*$  (**1B**) с константой ассоциации  $k_3$  и константой диссоциации  $k_4$ ;
- 6) отмывка для удаления несвязанных меченых антител;
- 7) измерение сигнала, пропорционального концентрации комплекса  $[Ab_1AgAb_2^*]$ .

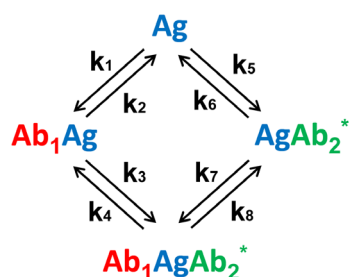


Рис. 7. Схема реакций в системе «сэндвич»-иммуноанализа (см. пояснения в тексте).

В идеале после стадии 4 на поверхности остаются только молекулы  $Ab_1$  и комплексы  $Ab_1Ag$ , но затем происходит диссоциация  $Ab_1Ag$  и в системе снова появляются свободные молекулы антигена. Поэтому во время стадии 5 протекают две дополнительные реакции:  $Ab_2^* + Ag \leftrightarrow Ab_2^*Ag$  (**1C**) и  $Ab_1 + AgAb_2^* \leftrightarrow Ab_1AgAb_2^*$  (**1D**) с константами ассоциации  $k_5$ ,  $k_7$  и константами диссоциации  $k_6$ ,  $k_8$  соответственно.

Полная схема реакций в «сэндвич»-иммуноанализе представлена на рис. 7.

D. Rodbard и Y. Feldman [155] рассматривают данные реакции в предположении, что первые антитела связаны с поверхностью необратимо, а несвязанные реагенты отмываются на каждой стадии полностью.

Представленная схема реакций описывается системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{\partial [Ab_1AgAb_2^*]}{\partial t} = k_3 [Ab_1Ag][Ab_2^*] + k_7 [AgAb_2^*][Ab_1] - (k_{d1} + k_{d2}) [Ab_1AgAb_2^*], \quad (37)$$

$$\frac{\partial [Ab_1Ag]}{\partial t} = k_1 [Ag][Ab_1] - k_2 [Ab_1Ag] - k_3 [Ab_1Ag][Ab_2^*] + k_4 [Ab_1AgAb_2^*], \quad (38)$$

$$\frac{\partial [AgAb_2^*]}{\partial t} = k_5 [Ag][Ab_2^*] - k_6 [AgAb_2^*] - k_7 [AgAb_2^*][Ab_1] + k_8 [Ab_1AgAb_2^*]. \quad (39)$$

Кроме того, из закона сохранения масс следуют дополнительные алгебраические уравнения:

$$p = [\text{Ag}] + [\text{Ab}_1\text{Ag}] + [\text{AgAb}_2^*] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*], \quad (40)$$

$$q_1 = [\text{Ab}_1] + [\text{Ab}_1\text{Ag}] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*], \quad (41)$$

$$q_2 = [\text{Ab}_2^*] + [\text{AgAb}_2^*] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]. \quad (42)$$

В совокупности получается система из шести уравнений с шестью неизвестными  $[\text{Ag}]$ ,  $[\text{Ab}_1]$ ,  $[\text{Ab}_2^*]$ ,  $[\text{Ab}_1\text{Ag}]$ ,  $[\text{AgAb}_2^*]$  и  $[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]$ ;  $p$ ,  $q_1$ ,  $q_2$  – суммарные концентрации связанных и свободных  $\text{Ag}$ ,  $\text{Ab}_1$ ,  $\text{Ab}_2$  соответственно.

Данную систему D. Rodbard и Y. Feldman решали численными методами или аналитически в приближении равновесных условий [155]. Аналитическое решение при подстановке  $R = [\text{Ab}_1\text{Ag}]/[\text{Ag}]$  после реакции (A1) дает уравнение:

$$R^2 + R(1 + K_1p - K_1q_1) - K_1q_1 = 0. \quad (43)$$

С учетом принятых допущений начальные условия для последующих реакций определяются уравнениями:

$$[\text{Ab}_1\text{Ag}]_0 = \left(\frac{R}{1+R}\right)p, \quad (44)$$

$$[\text{Ab}_1]_0 = q_1 - [\text{Ab}_1\text{Ag}]_0, \quad (45)$$

$$[\text{Ag}]_0 = 0. \quad (46)$$

Решение уравнения (43) относительно  $R$  дает выражение:

$$R = \frac{(K_1q_1 - 1 - K_1p) + \sqrt{((1 + K_1p - K_1q_1)^2 + 4K_1q_1)}}{2}. \quad (47)$$

После нахождения  $R$  можно рассчитать концентрации остальных компонентов системы. На рис. 8 приведены результаты численного моделирования в виде концентрационных зависимостей разных продуктов взаимодействия на последней стадии анализа.

Представленная модель показывает, что при увеличении концентрации добавленного аналита концентрация детектируемого комплекса  $[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]$  должна монотонно увеличиваться. Однако некоторые экспериментальные данные демонстрируют, что при высоких концентрациях аналита зависимость может меняться на противоположную [156]. Это явление получило название хук-эффекта (hook effect) [157, 158]. По этой причине D. Rodbard и Y. Feldman модифицировали предложенную ими модель и показали, что хук-эффект возникает при наличии субпопуляций антител с разной

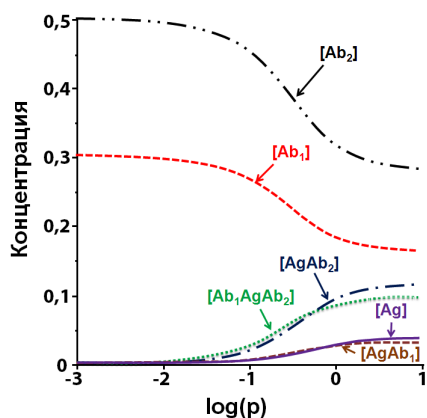


Рис. 8. Рассчитанные равновесные концентрации компонентов в системе «сэндвич»-анализа.

Параметры:  $q_1 = 3/K_1 = 0,3$ ;  $q_2 = 0,5$ ;  $k_1 = k_7 = 5$ ;  $k_3 = k_5 = 10$ ;  $k_2 = k_4 = k_6 = k_8 = 1$  (согласно [155]).

аффинностью или при неполной отмывке антигена после реакции с антителами [159].

Установлены и другие механизмы хук-эффекта. Например, при использовании меченых антител, которые конкурируют с немечеными за сайты связывания на антигене, также наблюдается хук-эффект, но только если концентрация меченых антител ниже концентрации немеченых [160]. Описан хук-эффект и при проведении одностадийного «сэндвич»-анализа, в котором антиген, меченые и немеченые антитела реагируют одновременно — см. рис. 2, В [161]. А.В. Жердев и Б.Б. Дзантиев с использованием микро-

планшетного ИФА показали, что хук-эффект может возникать в результате десорбции первых антител на последующих стадиях анализа, а также продемонстрировали, что для минимизации влияния эффектов десорбции и диссоциации важно проводить инкубацию со вторыми антителами как можно быстрее и не дольше, чем  $1/k_d$  [162].

Следует упомянуть ряд дополнительных подходов к моделированию биоаналитических систем и теоретическому исследованию влияния условий проведения анализа на его характеристики. Из перспективных средств математического описания необходимо отметить фрактальный анализ, используемый при рассмотрении разных видов биоаналитических систем в цикле работ А. Sadana и соавт. [163–165]. Теоретическая оценка влияния температуры на характеристики ИФА представлена R. Muller [166]. Программные средства для оптимизации конкурентного ИФА предложены в работе G.S. Sittampalam и соавт. [167]; аналогичные подходы развиты J. Tsoi и соавт. в [168]. Теоретические подходы к выбору условий для расширения рабочего диапазона ИФА обсуждаются N. Ohnuga и соавт. [169]. Вопросам одновременного учета требований к чувствительности и стоимости при оптимизации условий анализа посвящена работа M.A. Model и K.E. Healy [170].

## VI. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ВОЗМОЖНОСТЕЙ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Модель биохимического анализа дает исследователям возможность теоретической оценки предельных аналитических характеристик метода. Основные параметры, характеризующие аналитические системы, – это предел обнаружения (детекции), специфичность и время анализа [171, 172]. Наибольшее внимание исследователей было уделено расчету теоретических пределов обнаружения аналитов в различных форматах иммуноанализа [173–176].

Поскольку в любом формате биохимического анализа тем или иным способом детектируются комплексы аналит–рецептор, равновесные и кинетические константы этой реакции непосредственно влияют на параметры анализа. Однако предел обнаружения аналита также может быть лимитирован чувствительностью детекции метки, экспериментальными ошибками или уровнем неспецифического связывания в системе.

При рассмотрении данных вопросов следует строго дифференцировать понятия предела обнаружения и предела количественных измерений [23]. Предел детекции – это уровень аналита, обеспечивающий достоверно отличающийся от фона сигнал, тогда как пределу количественного измерения соответствует уровень аналита, измеряемый с определенной точностью, которую исследователь считает достаточной. Понятие предела обнаружения отражает лишь факт присутствия аналита в пробе и носит качественный характер. Данные вопросы особенно важны в контексте бурно развивающихся методов определения единичных молекул, которые стали возможными благодаря появлению сверхчувствительных измерительных систем, позволяющих детектировать сигнал от одной молекулы (частицы) метки [177–179]. Предел количественного определения для таких систем значительно выше единичных молекул.

Рассмотрим подробнее теоретические оценки предельных аналитических характеристик различных биоаналитических форматов и их связь с параметрами аффинного взаимодействия.

### КРИТЕРИЙ ДЖЕКСОНА–ЭКИНСА

В работе Т.М. Jackson и R.P. Ekins [176] впервые для неконкурентного и конкурентного иммуноанализа были установлены теоретические пределы детекции методов, их связь с характеристиками антител.

Для конкурентных форматов иммуноанализа показано определяющее влияние экспериментальных ошибок и аффинности используемых антител на предел обнаружения, выражаемое отношением:

$$\sigma_{\min,0} = CV_0 / Ka, \quad (48)$$

где  $\sigma_{\min,0}$  – теоретический минимум стандартного отклонения отклика системы при нулевой концентрации аналита,  $CV_0$  – коэффициент вариации отклика системы при нулевой концентрации аналита.

Т.М. Jackson и R.P. Ekins также установили, что потенциально для иммуноаналитических методов с прямой зависимостью между концентрацией аналита и величиной детектируемого сигнала предел обнаружения может быть уменьшен на несколько порядков. Однако в неконкурентных методах, помимо экспериментальных ошибок и аффинности антител, значительное влияние на предел обнаружения оказывают неспецифические взаимодействия, что описывается уравнением:

$$\sigma_{\min,0} = K_n * CV / Ka, \quad (49)$$

где  $\sigma_{\min,0}$  – теоретический минимум стандартного отклонения отклика системы при нулевой концентрации аналита,  $CV$  – относительная ошибка отклика системы при нулевой концентрации аналита,  $K_n$  – относительное значение неспецифического связывания. Например, при константе связывания с антителами  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , 1%  $CV$  и 1%-ном уровне неспецифического связывания теоретический минимум стандартного отклонения составляет  $10^{-16} \text{ M}$ .

Выражения (48), (49) выводятся в предположении, что метка имеет неограниченную активность и не лимитирует предел обнаружения.

J. Taylor и соавт. [150] приводят значения параметра предела детекции, рассчитанные по модели Т.М. Jackson и R.P. Ekins для различных значений  $Ka$  и  $CV_0$  в конкурентном формате анализа с использованием стандартного требования: минимально детектируемый сигнал должен в три раза превышать стандартное отклонение сигнала базовой линии (см. табл.). Представленные данные позволяют заключить, что при использовании антител с константой аффинности  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  в конкурентном формате иммуноанализа теоретически можно добиться предела обнаружения в фемтомолярном диапазоне концентраций. На основании модели Джексона–Экинса можно предположить, что при одинаковой аффинности антител предел детекции неконкурентного анализа может быть ниже предела детекции конкурентного метода на величину, обратно пропорциональную уровню неспецифического связывания ( $K_n$ ). Из этого предположения следует потенциально неограниченное снижение предела детекции при уменьшении  $K_n$ . В реальности при устранении неспецифического связывания предел детекции будет ограничен чувствительностью детекции метки.



Таблица. Теоретический предел детекции (DL) конкурентного иммуноанализа, рассчитанный по модели Т.М. Jackson и R.P. Ekins (по [150])

К (M <sup>-1</sup> )	DL (CV <sub>0</sub> = 1%)	DL (CV <sub>0</sub> = 3%)
10 <sup>12</sup>	30 fM	90 fM
10 <sup>10</sup>	3 pM	9 pM
2 × 10 <sup>9</sup>	15 pM	45 pM
10 <sup>8</sup>	300 pM	900 pM
10 <sup>7</sup>	3 nM	9 nM
10 <sup>6</sup>	30 nM	90 nM
10 <sup>5</sup>	300 nM	900 nM

Положения Т.М. Jackson и R.P. Ekins существенно повлияли на развитие биоаналитических систем, определив границы методов, использующих те или иные рецепторы и маркеры. Хотя ряд авторов обсуждает вопросы преодоления ограничений на чувствительность анализа, накладываемых данной моделью, речь идет не о ее опровержении, а о рассмотрении аналитических систем с другими подходами к детекции иммунных комплексов, включая методы детекции единичных молекул [23, 177, 180–182].

#### ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ АФФИННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ АНАЛИЗА

Процесс оптимизации биохимического анализа, включающего множество компонентов и стадий, как правило, требует проведения большого числа трудоемких экспериментов [167, 183]. Для упрощения данного процесса разработан ряд оптимизационных схем, таких как «Doehlert matrix» [184], «Box-Behnken design» [185], «Taguchi design» [186, 187], и др. [168, 188, 189]. Однако эти схемы не позволяют провести априорную оценку предельно достижимых аналитических показателей.

Количество публикаций, посвященных изучению корреляций между константами аффинного взаимодействия и характеристиками анализа, крайне ограничено. D. Rodbard и J.E. Lewald [190] первыми предложили алгоритм для построения градуировочных зависимостей РИА с целью предсказания пределов обнаружения. Теоретическая модель РИА, разработанная E. Ezan и соавт. [191] на основании закона действующих масс, дает зависимость:

$$C = \frac{1-b_c}{Kb_c(1-b_0)(1-b_0b_c)} - \frac{[Ag^*](b_c-1)}{b_c}, \quad (50)$$

где  $C$  – концентрация немеченого антигена;  $K$  – аффинность антител;  $[Ag^*]$  – начальная концентрация меченого антигена;  $b_0$  – отношение концентрации образовавшегося комплекса антиген–антитело к общей концентрации антигена в отсутствие немеченого антигена;  $b_c$  – то же отношение в присутствии немеченого антигена.

В рамках данной модели Е. Ezan и соавт. показали определяющее влияние параметра  $b_c$  на достижимый предел обнаружения:

$$b_{DL} = b_0 - ts \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_0}}, \quad (51)$$

где  $t$  – критерий Стьюдента;  $s$  – стандартное отклонение по параметру  $b_0$ ;  $n$  – количество измерений для одной концентрации антигена;  $n_0$  – количество определений параметра  $b_0$ ;  $b_{DL}$  – значение параметра  $b_c$  при концентрации немеченого антигена, соответствующей пределу обнаружения.

Собственно предел обнаружения ( $C_{DL}$ ) с учетом уравнения (50) вычисляется по формуле:

$$C_{DL} = \frac{1-b_{DL}}{Kb_{DL}(1-b_0)(1-b_0b_{DL})} - \frac{[Ag^*](b_{DL}-1)}{b_c}. \quad (52)$$

Данное выражение показывает, как следует варьировать условия проведения анализа для достижения минимального предела обнаружения. Например, при работе с высокоаффинными антителами ( $Ka > 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) следует уменьшить концентрацию меченого антигена. Если же аффинность антител значительно ниже, то количество меченого антигена рекомендуется увеличить, чтобы снизить ошибку измерений.

Подобные корреляции между константами аффинного взаимодействия и характеристиками анализа рассмотрены и в ряде других работ – для РИА [181], капиллярного иммуноэлектрофореза [150], ИФА [192, 193], ИХА [80, 95].

Учет факторов точности измерений при описании характеристик иммуноанализа обсуждается в [194]. Теоретические оценки пределов детекции и рабочих диапазонов иммуноаналитических систем даны также в работе [192]. Модель Y. Hayashi и соавт. [194] учитывает относительные стандартные отклонения ( $\rho_T$ ) по следующим параметрам: ошибки пипетирования антигена ( $\rho_A$ ), конъюгата антиген–фермент ( $\rho_G$ ), антитела ( $\rho_B$ ), субстрата для фермента ( $\rho_S$ ) и отличия в поглощении между разными лунками микропланшета ( $\sigma_{\mu}$ ):

$$\rho_T^2 = \frac{A^2}{(A+G)^2} (\rho_A^2 + \rho_G^2) + \rho_B^2 + \rho_S^2 + \left( \frac{\sigma_W}{f(A)} \times 100 \right)^2, \quad (53)$$

где  $A$  – концентрация аналита,  $G$  –  $IC_{50}$ .

Предложенная модель дает возможность, исходя из количественных характеристик реакции образования аффинного комплекса, установить оптимальные условия проведения конкурентного иммуноанализа.

Б.Б. Дзантиев и Д.К. Юрьев проанализировали взаимосвязь параметров аффинного взаимодействия и характеристик конкурентного анализа с последовательным насыщением [146]. Они показали, что при условии  $[Ab]_0 < 1/K_{a1}$  предел детекции определяется главным образом величиной  $1/K_{a1}$ , а при  $[Ab]_0 > 1/K_{a1}$  – величиной  $[Ab]_0$ . Отсюда логически следует, что оптимально использование антител с начальной концентрацией примерно равной  $1/K_{a1}$ . Также продемонстрировано сужение динамического диапазона определяемых концентраций при увеличении концентрации антител с двух порядков ( $0,1/K - 10/K$ ) при  $[Ab]_0 \ll 1/K_{a1}$  до одного ( $0,1[Ab]_0 - [Ab]_0$ ) при  $[Ab]_0 \gg 1/K_{a1}$ . Однако отмечается, что при снижении концентрации антител повышается относительная погрешность определения антигена из-за уменьшения наклона калибровочной кривой в области динамического диапазона.

## VII. ПРОТОЧНЫЕ БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Вслед за традиционными методами иммуноанализа, такими как РИА, ИФА и др., в лабораторную практику стали входить проточные биоаналитические системы. Рассмотрение открытых гетерогенных систем с проточным перемещением реагентов вызывает необходимость перехода к моделям более высокого уровня сложности. Теоретическому описанию проточных биосенсоров посвящен ряд работ [195–199]. Предложенные модели учитывают как геометрию реакционной системы, так и влияние диффузионного транспорта на кинетику связывания растворенных лигандов с иммобилизованными рецепторами [200]. Несмотря на сложность проточных гетерогенных систем, для эффективного прогнозирования их функционирования разрабатываются и используются модели, основанные на минимальном числе допущений и позволяющие дать общие аналитические описания взаимодействий.

Ниже будут рассмотрены результаты математического моделирования иммунохроматографических тест-систем – наиболее востребованных на сегодняшний день средств проточного иммуноанализа, что обусловлено простотой их применения и оценки получаемых результатов.

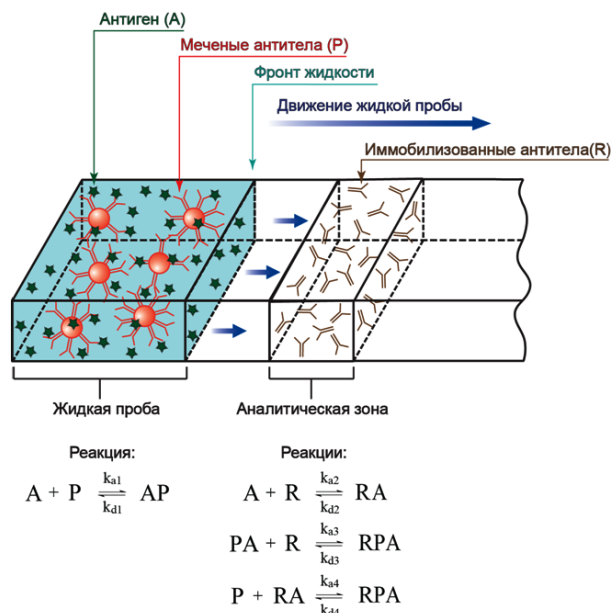


Рис. 9. Упрощенная схема «сэндвич»-ИХА для построения модели S. Qian и Н.Н. Вау.

Принципиальной особенностью мембранных систем является отличие свойств иммунореагентов в растворе и при иммобилизации. Перенос «эффективных констант», определенных для одного из вариантов анализа, в альтернативную систему весьма условен, равно как и рассмотрение количества иммобилизованных иммунореагентов в терминах объемной концентрации.

S. Qian и Н.Н. Вау в 2003–2004 гг. впервые разработали аналитические (нечисленные) модели ИХА в «сэндвич» и в конкурентном форматах [80, 95]. Упрощенная схема «сэндвич»-ИХА, использованная для моделирования, представлена на рис. 9. При движении фронта жидкости через мембрану тест-полоски на первой стадии происходит взаимодействие определяемого антигена с мечеными маркером антителами. После достижения фронтом жидкости аналитической зоны начинаются также реакции с иммобилизованными в аналитической зоне вторыми антителами, приводящие к образованию тройного детектируемого комплекса.

Для учета кинетики реакций комплексообразования, диффузии и потока жидкости в тест-полоске вводится система уравнений:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[A]}{\partial x} - (F_{PA} + F_{RA}) \quad (54)$$

$$\frac{\partial[PA]}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2[PA]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[PA]}{\partial x} - (F_{PA} + F_{RPA}^1) \quad (55)$$

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2[P]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[P]}{\partial x} - (F_{PA} + F_{RPA}^2). \quad (56)$$

где А – аналит; Р – центры связывания аналита на маркере; R – рецептор в аналитической зоне для связывания аналита; PA – комплекс аналита с маркером; RA – комплекс аналита с рецептором; RPA – комплекс аналита с маркером и рецептором в аналитической зоне; x – координата положения на тест-полоске (система считается одномерной);  $F_n$  – скорости образования n-ого комплекса; U – скорость потока жидкости;  $D_p$  – коэффициент диффузии.

Отметим, что комплексы, содержащие R, образуются только в аналитической зоне; поэтому их концентрация не зависит от потока и диффузии.

Принимаемое допущение [80, 95, 201] о том, что распределение компонентов в потоке подчиняется второму закону Фика, не учитывает ряда факторов: неспецифических взаимодействий с мембранами, десорбции, возможности предварительного перемешивания реагентов и др. Поэтому S. Qian и H.H. Vau [95], вводя в уравнения параметры, отражающие диффузионные процессы, реально анализируют упрощенный вариант для равномерно распределенных по объему реагентов.

Далее S. Qian и H.H. Vau рассматривают систему уравнений, описывающих образование комплексов AP, AR и APR:

$$F_{PA} = k_{a1}[A][P] - k_{d1}[PA], \quad (57)$$

$$F_{RA} = k_{a2}[A]([R_0] - [RA] - [RPA]) - k_{d2}[RA] - k_{a4}[RA][P] + k_{d4}[RPA], \quad (58)$$

$$F_{RPA} = F_{RPA}^1 + F_{RPA}^2, \quad (59)$$

$$F_{RPA}^1 = k_{a3}[PA]([R_0] - [RA] - [RPA]) - k_{d3}[RPA], \quad (60)$$

$$F_{RPA}^2 = k_{a4}[RA][P] - k_{d4}[RPA]. \quad (61)$$

где  $k_{ai}$  – кинетические константы ассоциации i-ой реакции,  $k_{di}$  – кинетические константы диссоциации i-ой реакции.

Данная система уравнений не решается в общем случае. Поэтому авторы дополнительно принимают допущение о равновесных усло-

виях, что позволяет рассчитать концентрацию комплекса RPA в аналитической зоне (пропорциональную регистрируемой интенсивности окрашивания) по уравнениям:

$$[RPA] = \frac{K_2[R_0][PA_e]}{1 + K_3[PA_e][R] + K_2[A]}, \quad (62)$$

$$[PA_e] = \frac{1}{2} \left( [A_0] + [P_0] + \frac{k_{d1}}{k_{a1}} - \sqrt{\left( [A_0] + [P_0] + \frac{k_{d1}}{k_{a1}} \right)^2 - 4[P_0][A_0]} \right). \quad (63)$$

Индекс «e» обозначает равновесную концентрацию, индекс 0 – начальную.

Эти же авторы (S. Qian и Н.Н. Вau) предложили математические модели для описания конкурентного формата ИХА. Модели были разработаны для двух случаев.

(I) Аналит связывается с иммобилизованным на мембрану антигеном, блокируя взаимодействие иммобилизованных антител с меченым конъюгатом. Чем больше аналита, тем меньше на мембране свободных центров связывания для конъюгата и тем меньше регистрируемый сигнал (рис. 2, Б).

(II) Аналит связывается с конъюгатом меченых антител и препятствует взаимодействию конъюгата с иммобилизованными на мембрану молекулами антигена. Чем больше аналита, тем меньше у конъюгата центров связывания, способных связаться в аналитической зоне (рис. 2, Г).

Напомним, что данная зависимость выведена в предположении о равновесных условиях иммунохроматографии. Однако согласно данным М. Ragavendar и С.М. Anmol [96], при параметрах, соответствующих реальным иммунореагентам:  $A_0 = 10^{-8}$ ;  $P_0 = 10^{-8}$ ;  $k_a = 10^6$ ;  $k_d = 10^{-3}$  и скорости потока жидкости 0,5 мм/сек, реакции на тест-полоске приблизятся к равновесным, только если аналитическая зона будет находиться на расстоянии около 12 см от места нанесения пробы. Данное расстояние значительно больше размеров рабочей мембраны стандартного иммунохроматографического теста (2,5 см). Т.е. в реальном ИХА реакции протекают в неравновесных условиях и требуют более сложного математического описания.

Представленные в литературе модели ИХА, учитывающие неравновесность процессов, используют численные подходы для расчета кинетики иммунных взаимодействий [202–204].

S. Krishnamoorthy и соавт. [205] для описания формирования иммунных комплексов в аналитической и контрольной зонах тест-

полосок предложили модель, учитывающую диффузию в порах мембран в сочетании с системой дифференциальных уравнений, отражающих взаимодействие в растворе. Модель рассматривает поток как двухфазную смесь: жидкая фаза, которая частично или полностью заполняет поры, и воздух, занимающий оставшееся пространство. Авторы предположили, что поток двумерный и потери реагентов с поверхности мембраны за счет испарения не происходит. С учетом усредненного объема плотность потока может считаться константой, а рассеянием, обусловленным вязкостью, можно пренебречь. Положение фронта жидкости пропорционально диффузионной константе, которая зависит от размера пор, вязкости и поверхностного натяжения. Данная система была численно охарактеризована для различных вариантов потоков реагентов (воды, коллоидного золота в воде, конъюгата коллоидного золота с БСА в воде) по мембранам с разным размером пор (от 4 до 20 мкм). Модель позволила описать влияние пористости мембран и положения линий связывания на количество формирующихся иммунных комплексов. Результаты экспериментального и теоретического изучения [205] показывают, что скорость потока в иммунохроматографической системе падает с удалением от стартовой линии, т.е. ее положение заметно влияет на чувствительность анализа. Скорость потока умеренно возрастает с увеличением размера пор. Это уменьшает время инкубации и, соответственно, интенсивность регистрируемого окрашивания. Данные закономерности подтверждены С.Л. Verli и Р.А. Клег при анализе модели «сэндвич»-ИХА [15]. Таким образом, на чувствительность ИХА влияют время, концентрации реагентов, размер пор и положение аналитической зоны.

ИХА для определения специфических антител имеет ряд особенностей, требующих отдельного теоретического рассмотрения. Иммунохроматографическая серодиагностика сходна с «сэндвич»-ИХА. Отличие серодиагностического анализа заключается в том, что определяемым веществом являются антитела, а антиген используется в качестве специфического рецептора. Важной особенностью серодиагностического ИХА является то, что на первой стадии анализа конъюгат маркера с иммуноглобулин-связывающим реагентом взаимодействует со всеми иммуноглобулинами в пробе, а в аналитической зоне происходит взаимодействие антигена только со специфическими иммуноглобулинами, которые составляют малую долю всех иммуноглобулинов крови. D.V. Sotnikov и соавт. [16] предложили аналитическую модель такой системы. В работе было показано, что для снижения предела обнаружения специфических антител

в ИХА следует использовать как можно более высокие концентрации реагентов для связывания антител и разбавлять пробу перед анализом не менее чем на порядок.

В перечисленных работах конъюгаты маркерных частиц с рецепторными молекулами представлялись как набор центров связывания аналитов, распределенных в реакционном объеме. Данные модели не учитывают размерные параметры маркерных частиц и состав их конъюгатов. Попытка оценки влияния данных параметров на характеристики «сэндвич»-ИХА предпринята в недавнем исследовании Liu и соавт. [206]. Согласно представленным выводам, для использования в «сэндвич»-ИХА оптимальны конъюгаты, имеющие около 30 центров связывания аналитов на одной маркерной частице.

## **VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представленный в обзоре анализ литературы подтверждает востребованность исследований по теоретическому описанию функционирования биоаналитических систем. Хотя применительно к каждой известной схеме анализа нереально измерение всех количественных параметров используемых в ней реагентов и теоретическое прогнозирование регистрируемого аналитического сигнала, наличие общих описаний биоаналитических процессов (прежде всего основанных на нечисленных решениях, описывающих функционирование систем в общем виде) представляется крайне востребованным. Используя установленные закономерности, можно формулировать общие рекомендации по выбору концентраций реагентов и длительности стадий анализа, выявлять факторы, лимитирующие достижение максимальной чувствительности, адаптировать аналитические системы под решение тех или иных практических задач. Теоретические модели позволяют установить предельные возможности тех или иных форматов анализа, оценить эффективность предлагаемых решений по усилению сигнала, сокращению продолжительности аналитических взаимодействий. Благодаря использованию теоретических описаний снижается трудоемкость разработки новых аналитических систем, становится возможным корректное сравнение потенциала разных форматов анализа.

### **Благодарности**

Авторы благодарят А.Н. Берлину (ФИЦ Биотехнологии РАН) за подготовку иллюстраций 1–3.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. (2010) Иммуноаналитические методы. В кн.: *Проблемы аналитической химии. Том 12: Биохимические методы анализа.* / Ред. Б.Б. Дзантиев. М.: Наука. 303–332.
2. Merrill, S.J. (1998) Computational models in immunological methods: an historical review, *Journal of Immunological Methods*, **216**, 69–92.
3. Fedorov, A.A., Kurochkin, V.E., Martynov, A.I., Petrov, R.V. (2010) Theoretical and experimental investigation of immunoprecipitation pattern formation in gel medium, *Journal of Theoretical Biology*, **264**, 37–44.
4. Goldberg, R.J. (1952) A theory of antibody – antigen reactions. I. Theory for reactions of multivalent antigen with bivalent and univalent antibody, *Journal of the American Chemical Society*, **74**, 5715–5725.
5. Steensgaard, J., Liu, B.M., Cline, G.B., Møller, N.P. (1977) The properties of immune complex-forming systems. A new theoretical approach, *Immunology*, **32**, 445–456.
6. Zhang, P., Wang, H.J. (2010) Statistics and thermodynamics in the growth of antigen-antibody complexes, *Chinese Journal of Physics*, **48**, 277–293.
7. Svitel, J., Boukari, H., Van Ryk, D., Willson, R.C., Schuck, P. (2007) Probing the functional heterogeneity of surface binding sites by analysis of experimental binding traces and the effect of mass transport limitation, *Biophysical Journal*, **92**, 1742–1758.
8. Svitel, J., Balbo, A., Mariuzza, R.A., Gonzales, N.R., Schuck, P. (2003) Combined affinity and rate constant distributions of ligand populations from experimental surface binding kinetics and equilibria, *Biophysical Journal*, **84**, 4062–4077.
9. Lebedev, K., Mafé, S., Stroeve, P. (2006) Convection, diffusion and reaction in a surface-based biosensor: modeling of cooperativity and binding site competition on the surface and in the hydrogel, *Journal of Colloid and Interface Science*, **296**, 527–537.
10. Hu, G., Gao, Y., Li, D. (2007) Modeling micropatterned antigen-antibody binding kinetics in a microfluidic chip, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 1403–1409.
11. Ylander, P. J., Hänninen, P. (2010) Modelling of multi-component immunoassay kinetics – A new node-based method for simulation of complex assays, *Biophysical Chemistry*, **151**, 105–110.
12. Jomeh, S., Hoorfar, M. (2010) Numerical modeling of mass transport in microfluidic biomolecule-capturing devices equipped with reactive surfaces, *Chemical Engineering Journal*, **165**, 668–677.
13. Friedrich, D., Please, C., Melvin, T. (2008) Optimisation of analyte transport in integrated microfluidic affinity sensors for the quantification of low levels of analyte, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **131**, 323–332.
14. Botkin, N.D., Turova, V.L. (2004) Mathematical models of a biosensor, *Applied Mathematical Modelling*, **28**, 573–589.
15. Berli, C.L., Kler, P.A. (2016) A quantitative model for lateral flow assays, *Microfluidics and Nanofluidics*, **20**, 104.
16. Sotnikov, D.V., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. (2017) Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay, *Analytical Chemistry*, **89**, 4419–4427.

17. Goryacheva, I.Y. (2016) Formats of rapid immunotests – Current-day formats, perspectives, pros and cons, *Comprehensive Analytical Chemistry*, **72**, 33–78.
18. Bilitewski, U. (2006) Protein-sensing assay formats and devices, *Analytica Chimica Acta*, **568**, 232–247.
19. Sajid, M., Kawde, A.N., Daud, M. (2015) Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *Journal of Saudi Chemical Society*, **19**, 689–705.
20. Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 121–131.
21. Sharma, S., Byrne, H., O’Kennedy, R.J. (2016) Antibodies and antibody-derived analytical biosensors, *Essays in Biochemistry*, **60**, 9–18.
22. Егоров, А.М., Осипов, А.П., Дзантиев, Б.Б., Гаврилова, Е.М. (1991) Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа. 288 с.
23. Woolley, C.F., Hayes, M.A., Mahanti, P., Gilman, S.D., Taylor, T. (2015) Theoretical limitations of quantification for noncompetitive sandwich immunoassays, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **407**, 8605–8615.
24. Chang, L., Rissin, D.M., Fournier, D.R., Piech, T., Patel, P.P., Wilson, D.H., Duffy, D.C. (2012) Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: Theoretical considerations, *Journal of Immunological Methods*, **378**, 102–115.
25. Fan, M., He, J. (2012) Recent progress in noncompetitive hapten immunoassays: a review. In *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. / Ed. E. Abuelzein. Rijeka: InTech, 53–66.
26. Ueda, H. (2002). Open sandwich immunoassay: A novel immunoassay approach based on the interchain interaction of an antibody variable region, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**, 614–619.
27. Smith, D.S., Eremin, S.A. (2008) Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 1499–1507.
28. Goulko, A.A., Zhao, Q., Guthrie, J.W., Zou, H., Le, X.C. (2008) Fluorescence polarization: recent bioanalytical applications, pitfalls, and future trends. In *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I*. / Ed. O.S. Wolfbeis. Leipzig: Springer, 303–322.
29. Shi, J., Tian, F., Lyu, J., Yang, M. (2015) Nanoparticle based fluorescence resonance energy transfer (FRET) for biosensing applications, *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 6989–7005.
30. Lee, J.Y., Kim, J.S., Park, J.C., Nam, Y.S. (2016) Protein–quantum dot nanohybrids for bioanalytical applications, *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **8**, 178–190.
31. Abe, R., Ohashi, H., Iijima, I., Ihara, M., Takagi, H., Hoshida, T., Ueda, H. (2011) «Quenchbodies»: quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence, *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 17386–17394.
32. Wongso, D., Dong, J., Ueda, H., Kitaguchi, T. (2017) Flashbody: a next generation Fluobody with fluorescence intensity enhanced by antigen binding, *Analytical Chemistry*, **89**, 6719–6725.
33. Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B., Trubaceva, J.N. (1997) Homogeneous enzyme immunoassay for pyrethroid

- pesticides and their derivatives using bacillary alpha-amylase as label, *Analytica Chimica Acta*, **347**, 131–138.
34. Chiu, M.L., Lai, D., Monbouquette, H.G. (2011) An influenza hemagglutinin A peptide assay based on the enzyme-multiplied immunoassay technique, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, **32**, 1–17.
35. Curtis, E.G., Patel, J.A. (1978) Enzyme multiplied immunoassay technique: a review, *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **9**, 303–320.
36. Polshchitsin, A.A., Nekrasov, V.M., Zakovryashin, V.S., Yakovleva, G.E., Maltsev, V.P., Yurkin, M.A., Chernyshev, A.V. (2017) Kinetic turbidimetry of patchy colloids aggregation: Latex particles immunoagglutination, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **516**, 72–79.
37. Prieв, A., Sarvazyan, A., Dzantiev, B., Zherdev, A., Cherednikova, T. (1990) Alterations in adiabatic compressibility of monoclonal and polyclonal antibodies induced by interactions with antigens, *Molecular Biology*, **24** (3), 514–521.
38. Sheikh, S., Blaszykowski, C., Thompson, M. (2008) Acoustic wave-based detection in bioanalytical chemistry: competition for surface plasmon resonance? *Analytical Letters*, **41**, 2525–2538.
39. Schrittwieser, S., Pelaz, B., Parak, W.J., Lentijo-Mozo, S., Soulantica, K., Dieckhoff, J., Ludwig, F., Guenther, A., Tschöpe, A., Schotter, J. (2016) Homogeneous biosensing based on magnetic particle labels, *Sensors*, **16**, 828.
40. Урусов, А.Е., Петракова, А.В., Жердев, А.В., Дзантиев, Б.Б. (2017) Применение магнитных наночастиц в иммуноанализе, *Российские нанотехнологии*, в печати.
41. Uehara, N., Numanami, Y., Oba, T., Onishi, N., Xie, X. (2015). Thermal-induced immuno-nephelometry using gold nanoparticles conjugated with a thermoresponsive polymer for the detection of avidin, *Analytical Sciences*, **31**, 495–501.
42. Dzantiev, B.B., Zherdev, A.V., Yazygina, E.V. (2002) Application of water-soluble polymers and their complexes for immunoanalytical purposes. In *Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing*. / Eds. B. Mattiasson, I. Yu. Galaev. London–NY: Taylor Fransis, 207–229.
43. Englebienne, P., Weiland, M. (1996) Synthesis of water-soluble carboxylic and acetic acid-substituted poly(thiophenes) and the application of their photochemical properties in homogeneous competitive immunoassays, *Chemical Communications*, **14**, 1651–1652.
44. Chen, J.P., Huffman, A.S. (1990) Polymer-protein conjugates: II. Affinity precipitation separation of human immunoglobulin by a poly(N-isopropylacrylamide)-protein A conjugate, *Biomaterials*, **11**, 631–634.
45. Ryan, K.J., Ray, C.G. (eds.) (2004). *Sherris Medical Microbiology*. McGraw-Hill Education. 247–249.
46. Chareonsirisuthigul, T., Khositnithikul, R., Intaramat, A., Inkomlue, R., Sriwanichrak, K., Piromsontikorn, S., Kitiwanwanich, S., Lowhnoo, T., Yingyong, W., Chairprasert, A., Banyong, R. (2013) Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **76**, 42–45.
47. Abebe, F., Holm-Hansen, C., Wiker, H.G., Bjune, G. (2007) Progress in

- serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Scandinavian Journal of Immunology*, **66**, 176–191.
48. Mauriz, E., García-Fernández, M.C., Lechuga, L.M. (2016) Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, **79**, 191–198.
  49. Homola, J. (2008) Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*, **108**, 462–493.
  50. Yuan, Y., Panwar, N., Yap, S.H.K., Wu, Q., Zeng, S., Xu, J., Tjin, S.C., Song, J., Qu, J., Yong, K.T. (2017) SERS-based ultrasensitive sensing platform: An insight into design and practical applications, *Coordination Chemistry Reviews*, **337**, 1–33.
  51. Qiao, X., Zhang, X., Tian, Y., Meng, Y. (2016) Progresses on the theory and application of quartz crystal microbalance, *Applied Physics Reviews*, **3**, 031106.
  52. Rich, R.L., Myszka, D.G. (2010) Grading the commercial optical biosensor literature – Class of 2008: «The Mighty Binders», *Journal of Molecular Recognition*, **23**, 1–64.
  53. Yalow, R.S., Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *The Journal of Clinical Investigation*, **39**, 1157–1175.
  54. Avrameas, S., Uriel, J. (1966) Method of antigen and antibody labeling with enzymes and its immunodiffusion application, *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, **262**, 2543–2545.
  55. Nakane, P.K., Pierce, G.B.Jr. (1967) Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *The Journal of Cell Biology*. **33**, 307–318.
  56. Engvall, E., Perlman, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*, **8**, 871–874.
  57. van Weeman, B.K., Schuur, A.H. (1975) The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays, *Immunochemistry*, **12**, 667–670.
  58. Jolley, M.E., Stroupe, S.D., Schwenzer, K.S., Wang, C.J., Lu-Steffes, M., Hill, H.D., Popeika, S.R., Holen, J.T., Kelso, D.M. (1981) Fluorescence polarization immunoassay. iii. an automated system for therapeutic drug determination, *Clinical Chemistry*, **27**, 1575–1579.
  59. Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., van Amerongen, A. (2009) Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**, 569–582.
  60. Dzantiev, B.B., Byzova, N.A., Urusov, A.E., Zherdev, A.V. (2014) Immunochromatographic methods in food analysis, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, **55**, 81–93.
  61. Goryacheva, I.Y., Lenain, P., De Saeger, S. (2013) Nanosized labels for rapid immunotests, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, **46**, 30–43.
  62. Huang, X., Aguilar, Z.P., Xu, H., Lai, W., Xiong, Y. (2016) Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, **75**, 166–180.
  63. Ronald, A., Stimson W.H. (1998) The evolution of immunoassay technology, *Parasitology*, **117**, S13–S27.
  64. Shan, S., Lai, W., Xiong, Y., Wei, H., Xu, H. (2015) Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay

- sensitivity for detecting foodborne pathogens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 745–753.
65. Rodríguez, M.O., Covián, L.B., García, A.C., Blanco-López, M.C. (2016) Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays, *Talanta*, **148**, 272–278.
66. Cao, X., Ye, Y., Liu, S. (2011) Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing, *Analytical Biochemistry*, **417**, 1–16.
67. Рязанцев Д.Ю., Воронина Д.В., Завриев С.К. (2016) Иммуно-ПЦР: достижения и перспективы, *Успехи биологической химии*, **56**, 377–410.
68. Chang, L., Li, J., Wang, L. (2016) Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection, *Analytica Chimica Acta*, **910**, 12–24.
69. Gooding, J.J., Gaus, K. (2016) Single-molecule sensors: Challenges and opportunities for quantitative analysis, *Angewandte Chemie International Edition*, **55**, 11354–11366.
70. Ma, F., Li, Y., Tang, B., Zhang, C.Y. (2016) Fluorescent biosensors based on single-molecule counting, *Accounts of Chemical Research*, **49**, 1722–1730.
71. Kuang, H., Xing, C., Hao, C., Liu, L., Wang, L., Xu, C. (2013) Rapid and highly sensitive detection of lead ions in drinking water based on a strip immunosensor, *Sensors*, **13**, 4214–4224.
72. Stenberg, M., Nygren, H. (1985) A diffusion limited reaction theory for a solid-phase immunoassay. *Journal of Theoretical Biology*, **113**, 589–597.
73. Stenberg, M., Werthén, M., Theander, S., Nygren, H. (1988) A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay, *Journal of Immunological Methods*, **112**, 23–29.
74. Stenberg, M., Stibler, L., Nygren, H. (1986) External diffusion in solid-phase immunoassays, *Journal of Theoretical Biology*, **120**, 129–140.
75. Klenin, K.V., Kusnezow, W., Langowski, J. (2005) Kinetics of protein binding in solid-phase immunoassays: Theory, *The Journal of Chemical Physics*, **122**, 214715.
76. Kusnezow, W., Syagailo, Y.V., Rüf-fer, S., Klenin, K., Sebald, W., Hoheisel, J.D., Gauer, C., Goychuk, I. (2006) Kinetics of antigen binding to antibody microspots: Strong limitation by mass transport to the surface, *Proteomics*, **6**, 794–803.
77. Nadim, A. (2009) Modeling of mass transfer limitation in biomolecular assays, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1161**, 34–43.
78. Philibert, J. (2005) One and a half century of diffusion: Fick, Einstein, before and beyond, *Diffusion Fundamentals*, **2**, 1–19.
79. Mehrer, H., Stolwijk, N.A. (2009) Heroes and highlights in the history of diffusion, *Diffusion Fundamentals*, **11**, 1–32.
80. Qian, S., Bau, H.H. (2003) A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays, *Analytical Biochemistry*, **322**, 89–98.
81. Rath, D., Panda, S. (2015) Contribution of rotational diffusivity towards the transport of antigens in heterogeneous immunosensors, *Analytyst*, **140**, 6579–6587.
82. Sadana, A., Sadana, N. (2008) Fractal Analysis of Binding and Dissociation of Protein-Analyte Interactions on Biosensor Surfaces. Amsterdam: Elsevier, 361 p.
83. Kusnezow, W., Syagailo, Y.V., Rüf-fer, S., Baudenstiel, N., Gauer, C., Hoheisel, J.D., Wild, D., Goychuk, I.



- (2006) Optimal design of microarray immunoassays to compensate for kinetic limitations theory and experiment, *Molecular and Cellular Proteomics*, **5**, 1681–1696.
84. Zhao, M., Wang, X., Nolte, D. (2010) Mass-transport limitations in spot-based microarrays, *Biomedical Optics Express*, **1**, 983–997.
85. Dong, J., Ueda, H. (2017) ELISA-type assays of trace biomarkers using microfluidic methods, *Nanomedicine and Nanobiotechnol.*, **9**, e1457.
86. Li, J., Zrazhevskiy, P., Gao, X. (2016) Eliminating size-associated diffusion constraints for rapid on-surface bioassays with nanoparticle probes, *Small*, **12**, 1035–1043.
87. Zhao, M.X., Li, J., Gao, X. (2017) Eliminating diffusion limitations at the solid–liquid interface for rapid polymer deposition, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, **3**, 782–786.
88. Wang, G., Driskell, J.D., Porter, M.D., Lipert, R.J. (2009) Control of antigen mass transport via capture substrate rotation: binding kinetics and implications on immunoassay speed and detection limits, *Analytical Chemistry*, **81**, 6175–6185.
89. Wang, B., Cheng, X. (2016) Enhancement of binding kinetics on affinity substrates by laser point heating induced transport, *Analyst*, **141**, 1807–1813.
90. Driskell, J.D., Kwarta, K.M., Lipert, R.J., Vorwald, A., Neill, J.D., Ridpath, J.F., Porter, M.D. (2006) Control of antigen mass transfer via capture substrate rotation: An absolute method for the determination of viral pathogen concentration and reduction of heterogeneous immunoassay incubation times, *Journal of Virological Methods*, **138**, 160–169.
91. Boraker, D.K., Bugbee, S.J., Reed, B.A. (1992) Acoustic probe-based ELISA, *Journal of Immunological Methods*, **155**, 91–94.
92. Chen, R., Weng, L., Sizto, N.C., Osorio, B., Hsu, C.J., Rodgers, R., Litman, D.J. (1984) Ultrasound-accelerated immunoassay, as exemplified by enzyme immunoassay of choriogonadotropin, *Clinical Chemistry*, **30**, 1446–1451.
93. Beumer, T., Haarbosch, P., Carpay, W. (1996) Convection during incubation of microplate solid phase immunoassay: effects on assay response and variation, *Analytical Chemistry*, **68**, 1375–1380.
94. Варфоломеев, С.Д., Гуревич, К.Г. (1999) Биокинетика: практический курс. М.: Фаир-пресс, 720 с.
95. Qian, S., Bau, H.H. (2004) Analysis of lateral flow biodetectors: Competitive format, *Analytical Biochemistry*, **326**, 211–224.
96. Ragavendar, M., Anmol, C.M. (2012) A mathematical model to predict the optimal test line location and sample volume for lateral flow immunoassays, *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE*, 2408–2411.
97. Landry, J.P., Ke, Y., Yu, G.L., Zhu, X.D. (2015) Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform, *Journal of Immunological Methods*, **417**, 86–96.
98. Atkins, P., de Paula, J. (2006) Physical Chemistry. N.Y.: W. H. Freeman and company, 802–803.
99. Schlosshauer, M., Baker, D. (2004) Realistic protein-protein association rates from a simple diffusional model neglecting long-range interactions, free energy barriers, and landscape ruggedness, *Protein Science*, **13**, 1660–1669.

100. Maynard, J., Georgiou, G. (2000) Antibody engineering, *Annual Review of Biomedical Engineering*, **2**, 339–376.
101. Foote, J., Eisen, H.N. (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 1254–1256.
102. Batista, F.D., Neuberger, M.S. (1998) Affinity dependence of the B cell response to antigen: A threshold, a ceiling, and the importance of off-rate, *Immunity*, **8**, 751–759.
103. Cauerhff, A., Goldbaum, F.A., Braden, B.C. (2004) Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 3539–3544.
104. Chmura, A.J., Orton, M.S., Meares, C.F. (2001) Antibodies with infinite affinity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 8480–8484.
105. Trisler, K., Looger, L.L., Sharma, V. (2007) A metalloantibody that irreversibly binds a protein antigen, *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 26344–26353.
106. Zheng, X., Bi, C., Li, Z., Podariu, M., Hage, D.S. (2015) Analytical methods for kinetic studies of biological interactions: a review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **113**, 163–180.
107. Seveler, D., Bruera, M.R., Gatti, C.A. (1986) Measurement of antigen-antibody binding constants by elution of affinity chromatography columns with continuous concentration gradients of dissociating agents, *Immunological Investigations*, **15**, 497–503.
108. Heegaard, N.H. (1994) Determination of antigen – antibody affinity by immuno-capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, **680**, 405–412.
109. Krylov, S.N. (2007). Kinetic CE: Foundation for homogeneous kinetic affinity methods, *Electrophoresis*, **28**, 69–88.
110. Pan, Y., Sackmann, E.K., Wypisniak, K., Hornsby, M., Datwani, S.S., Herr, A.E. (2016). Determination of equilibrium dissociation constants for recombinant antibodies by high-throughput affinity electrophoresis, *Scientific Reports*, **6**, 39774.
111. Nikolovska-Coleska, Z., Wang, R., Fang, X., Pan, H., Tomita, Y., Li, P., Röller, P.P., Krajewski, K., Saito, N.G., Stuckey, J.A., Wang, S. (2004). Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization, *Analytical Biochemistry*, **332**, 261–273.
112. Xie, C., Dong, C., Ren, J. (2009). Study on homogeneous competitive immune reaction by fluorescence correlation spectroscopy: Using synthetic peptide as antigen, *Talanta*, **79**, 971–974.
113. Gielen, F., Butz, M., Rees, E.J., Erdelyi, M., Moschetti, T., Hyvönen, M., Edel, J.B., Kaminski, C.F., Hollfelder, F. (2017). Quantitative affinity determination by fluorescence anisotropy measurements of individual nanoliter droplets, *Analytical Chemistry*, **89**, 1092–1101.
114. Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavad-Ohanian, L., Goldberg, M.E. (1985) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Immunological Methods*, **77**, 305–319.
115. Hardy, F., Djavad-Ohanian, L., Goldberg, M.E. (1997) Measure-

- ment of antibody/antigen association rate constants in solution by a method based on the enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Immunological Methods*, **200**, 155–159.
116. Goldberg, M.E., Djavadi-Ohanian, L. (1993) Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA, *Current Opinion in Biotechnology*, **5**, 278–281.
117. Stevens, F.J., Bobrovnik, S.A. (2007) Deconvolution of antibody affinities and concentrations by non-linear regression analysis of competitive ELISA data, *Journal of Immunological Methods*, **328**, 53–58.
118. Bobrovnik, S.A., Demchenko, M., Komisarenko, S., Stevens, F. (2010) Traditional ELISA methods for antibody affinity determination fail to reveal the presence of low affinity antibodies in antisera: an alternative approach, *Journal of Molecular Recognition*, **23**, 448–456.
119. Bobrovnik, S. (2005) New capabilities in determining the binding parameters for ligand–receptor interaction, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **65**, 30–44.
120. Bobrovnik, S.A. (2003) Determination of antibody affinity by ELISA. Theory, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **57**, 213–236.
121. Bobrovnik, S.A. (2002) Ligand–receptor interaction. Klotz–Hunston problem for two classes of binding sites and its solution. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **52**, 135–143.
122. Rich, R.L., Myszka, D.G. (2008) Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature, *Journal of Molecular Recognition*, **21**, 355–400.
123. Schasfoort, R.B.M., Tudos, A.J. (eds.). (2008) Handbook of Surface Plasmon Resonance. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 403 p.
124. Schuck, P. (1997) Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors, *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 498–502.
125. Mehand, M.S., Crescenzo, G.D., Srinivasan, B. (2014) On-line kinetic model discrimination for optimized surface plasmon resonance experiments, *Journal of Molecular Recognition*, **27**, 276–284.
126. Edwards, D.A. (2004) Refining the measurement of rate constants in the BIAcore, *Journal of Mathematical Biology*, **49**, 272–292.
127. Mason, T., Pineda, A.R., Wofsy, C., Goldstein, B. (1999) Effective rate models for the analysis of transport-dependent biosensor data, *Mathematical Biosciences*, **159**, 123–144.
128. O'Shannessy, D.J. (1994) Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: A critique of the surface plasmon resonance literature, *Current Opinion in Biotechnology*, **5**, 65–71.
129. Kolosova, A.Y., Samsonova, J.V., Egorov, A.M. (2000) Competitive ELISA of chloramphenicol: influence of immunoreagent structure and application of the method for the inspection of food of animal origin, *Food and Agricultural Immunology*, **12**, 115–125.
130. Zvereva, E.A., Byzova, N.A., Sveshnikov, P.G., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. (2015) Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol, *Analytical Methods*, **7**, 6378–6384.



131. Dzantiev, B.B., Zherdev, A.V., Romanenko, O.G., Sapegova, L.A. (1996) Development and comparative study of different immuno-enzyme techniques for pesticides detection, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **65**, 95–111.
132. Macken, C.A., Perelson, A.S. (1982) Aggregation of cell surface receptors by multivalent ligands, *Journal of Mathematical Biology*, **14**, 365–370.
133. Yang, T., Baryshnikova, O.K., Mao, H., Holden, M.A., Cremer, P.S. (2003) Investigations of bivalent antibody binding on fluid-supported phospholipid membranes: the effect of hapten density, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 4779–4784.
134. Hlavacek, W.S., Posner, R.G., Perelson, A.S. (1999) Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors, *Biophysical Journal*, **76**, 3031–3043.
135. Reynolds, J.A. (1979) Interaction of divalent antibody with cell surface antigens, *Biochemistry*, **18**, 264–269.
136. Gelinsky-Wersing, D., Wersing, W., Pompe, W. (2017) Bivalent kinetic binding model to surface plasmon resonance studies of antigen-antibody displacement reactions, *Analytical Biochemistry*, **518**, 110–125.
137. Winzor, D.J. (2011) Allowance for antibody bivalence in the characterization of interactions by ELISA, *Journal of Molecular Recognition*, **24**, 139–148.
138. Vos, Q., Klasen, E.A., Haaijman, J.J. (1987) The effect of divalent and univalent binding on antibody titration curves in solid-phase ELISA, *Journal of Immunological Methods*, **103**, 47–54.
139. Perelson A.S., DeLisi C., Weigel F.W. (eds.). (1984) Some mathematical models of receptor clustering by multivalent ligands. In: *Cell Surface Dynamics*. New York: Marcel Dekker, 223–277.
140. Larsson, Å. (1989) Divalent binding of monoclonal antibody to a cell surface antigen. Modelling of equilibrium data, *Molecular Immunology*, **26**, 735–739.
141. Shiau, L.D. (1995) Modeling the average molecular weights of antigen-antibody complexes by probability theory, *Journal of Immunological Methods*, **178**, 267–275.
142. Joshi, R.R. (1995) Statistical mechanics of antibody-antigen binding: Affinity analysis, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **218**, 214–228.
143. Van Opheusden, J.H.J., Wiegel, F.W., Goldstein, B. (1984) Forward rate constants for receptor clusters variational methods for upper and lower bounds, *Biophysical Chemistry*, **20**, 237–248.
144. Hlavacek, W.S., Perelson, A.S., Sulzer, B., Bold, J., Paar, J., Gorman, W., Posner, R.G. (1999) Quantifying aggregation of IgE-FcεRI by multivalent antigen, *Biophysical Journal*, **76**, 2421–2431.
145. Hendrickson, O.D., Zherdev, A.V., Kaplun, A.P., Dzantiev, B.B. (2002) Experimental study and mathematical modeling of the interaction between antibodies and antigens on the surface of liposomes, *Molecular Immunology*, **39**, 413–422.
146. Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Смирнова М.Б., Павлова Е.В., Коляскина Г.И., Гуревич К.Г., Гнеденко О.В., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И., Осипов А.П., Дмитриев А.Д., Егоров А.М. (2002) Анализ свя-

- звания биспецифических моноклональных антител с иммобилизованным антигеном с помощью оптического биосенсора, *Биохимия*, **67**, 1643–1654.
147. Edeling, M.A., Austin, S.K., Shrestha, B., Dowd, K.A., Mukherjee, S., Nelson, C.A., Johnson, S., Mabila, M.N., Christian, E.A., Rucker, J., Pierson, T.C. (2014) Potent dengue virus neutralization by a therapeutic antibody with low monovalent affinity requires bivalent engagement, *PLoS Pathogens*, **10**, e1004072.
  148. Crothers, D., Metzger, H. (1972) The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies, *Immunochemistry*, **9**, 341–357.
  149. Berson, S.A., Yalow, R.S. (1959) Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin-binding antibody, *Journal of Clinical Investigation*, **38**, 1996–2016.
  150. Taylor, J., Picelli, G., Harrison, D.J. (2001) An evaluation of the detection limits possible for competitive capillary electrophoretic immunoassays, *Electrophoresis*, **22**, 3699–3708.
  151. Wang, Z.X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule, *FEBS Letters*, **360**, 111–114.
  152. Roehrl, M.H., Wang, J.Y., Wagner, G. (2004) A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein–protein interactions by fluorescence polarization, *Biochemistry*, **43**, 16056–16066.
  153. Rodbard, D., Ruder, H.J., Vaitukaitis, J., Jacobs, H.S. (1971) Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **33**, 343–355.
  154. Дзантиев Б.Б., Юрьев Д.К. (1988) Некоторые закономерности иммунохимического анализа. Метод последовательного насыщения, *Прикладная биохимия и микробиология*, **24**, 830–838.
  155. Rodbard, D., Feldman, Y. (1978) Kinetics of two-site immunoradiometric («sandwich») assays. – I: Mathematical models for simulation, optimization, and curve fitting, *Immunochemistry*, **15**, 71–76.
  156. Miles, L.E.M., Bieber, C.P., Eng, L.F., Lipschitz, D.A. (1974) Properties of two-site immunoradiometric (labelled antibody) assay systems. In *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Proceedings of the International Atomic Energy Agency*, Istanbul: IAEA, **149**, 163.
  157. Rey, E.G., O'Dell, D., Mehta, S., Erickson, D. (2017) Mitigating the hook effect in lateral flow sandwich immunoassays using real-time reaction kinetics, *Analytical Chemistry*, **89**, 5095–5100.
  158. Jassam, N., Jones, C.M., Briscoe, T., Horner, J.H. (2006) The hook effect: A need for constant vigilance, *Annals of Clinical Biochemistry*, **43**, 314–317.
  159. Rodbard, D., Feldman, Y., Jaffe, M.L., Miles, L.E.M. (1978) Kinetics of two-site immunoradiometric («sandwich») assays. – II: Studies on the nature of the high-dose hook effect, *Immunochemistry*, **15**, 77–82.
  160. Ryall, R.G., Story, C.J., Turner, D.R. (1982) Reappraisal of the causes of the «hook effect» in two-site immunoradiometric assays, *Analytical Biochemistry*, **127**, 308–315.

161. Fernando, S.A., Wilson, G.S. (1992) Studies of the «hook» effect in the one-step sandwich immunoassay, *Journal of Immunological Methods*, **151**, 47–66.
162. Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. (1996) Некоторые закономерности формирования на твердой фазе комплексов антитело – антиген – антитело: экспериментальное изучение и математическое моделирование, *Прикладная биохимия и микробиология*, **32**, 194–202.
163. Morris, V.A. Sadana, A. (2005) A fractal analysis of pathogen detection by biosensors, *Biophysical Chemistry*, **113**, 67–81.
164. Butala, H.D., Tan, Y., Sadana, A. (2004) Analyte-receptor binding on surface plasmon resonance biosensors: a fractal analysis of CreloxP interactions and the influence of Cl, O, and S on drug-liposome interactions, *Analytical Biochemistry*, **332**, 10–22.
165. Butala, H.D., Sadana, A. (2004) Binding and dissociation kinetics using fractals: an analysis of electrostatic effects and randomly coupled and oriented coupled receptors on biosensor surfaces, *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 933–944.
166. Muller, R. (1998) A mathematical model to predict the effects of temperature on timed ELISA, *Food and Agricultural Immunology*, **10**, 297–305.
167. Sittampalam, G.S., Smith, W.C., Miyakawa, T.W., Smith, D.R., McMorris, C. (1996) Application of experimental design techniques to optimize a competitive ELISA, *Journal of Immunological Methods*, **190**, 151–161.
168. Tsoi, J., Patel, V., Shih, J. (2014) A practical approach to automate randomized design of experiments for ligand-binding assays, *Bioanalysis*, **6**, 705–713.
169. Ohmura, N., Tsukidate, Y., Shinozaki, H., Lackie, S.J., Saiki, H. (2003) Combinational use of antibody affinities in an immunoassay for extension of dynamic range and detection of multiple analytes, *Analytical Chemistry*, **75**, 104–110.
170. Model, M.A., Healy, K.E. (1999) Optimization of the cost and sensitivity of receptor-and enzyme-based assays, *Analytical Biochemistry*, **271**, 59–69.
171. Wild, D. (ed.). (2013) The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Kidlington: Elsevier, 1036 p.
172. Van Emon J.M. (ed.). (2007) Immunoassay and other bioanalytical techniques. Boca Raton: CRC Press, Taylor Francis, 512 p.
173. Schuurman, H.J., De Ligny, C.L. (1979) Physical models of radioimmunoassay applied to the calculation of the detection limit, *Analytical Chemistry*, **51**, 2–7.
174. Hemmilä, I., Dakubu, S., Mikkala, V.-M., Siitari, H., Lövgren, T. (1984) Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays, *Analytical Biochemistry*, **137**, 335–343.
175. Griswold, W. (1987) Theoretical analysis of the sensitivity of the solid phase antibody assay (ELISA), *Molecular Immunology*, **24**, 1291–1294.
176. Jackson, T.M., Ekins, R.P. (1986) Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: Current practice and potential advantages of fluorescent  $\text{Eu}^{3+}$  chelates as non-radioisotopic tracers, *Journal of Immunological Methods*, **87**, 13–20.

177. Rissin, D.M., Kan, C.W., Campbell, T.G., Howes, S.C., Fournier, D.R., Song, L., Piech, T., Patel, P.P., Chang, L., Rivnak, A.J., Ferrell, E.P., Randall, J.D., Provuncher, G.K., Walt, D.R., Duffy, D.C. (2010) Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations, *Nature Biotechnology*, **28**, 595–599.
178. Tessler, L.A., Mitra, R.D. (2011) Sensitive single-molecule protein quantification and protein complex detection in a microarray format, *Proteomics*, **11**, 4731–4735.
179. Schmidt, R., Jacak, J., Schirwitz, C., Stadler, V., Michel, G., Marmé, N., Schütz, G.J., Hoheisel, J.D., Kne-meyer, J.-P. (2011). Single-molecule detection on a protein-array assay platform for the exposure of a tuberculosis antigen, *Journal of Proteome Research*, **10**, 1316–1322.
180. Brown, E.N., McDermott, T.J., Bloch, K.J., McCollom, A.D. (1996) Defining the smallest analyte concentration an immunoassay can measure, *Clinical chemistry*, **42**, 893–903.
181. O'Connor, T., Gosling, J.P. (1997) The dependence of radioimmunoassay detection limits on antibody affinity, *Journal of Immunological Methods*, **208**, 181–189.
182. Ekins, R., Kelso, D. (2011) Single-molecule ELISA, *Clinical Chemistry*, **57** (3), 372–375.
183. Yakovleva, J., Zherdev, A.V., Popova, V.A., Eremin, S.A., Dzan-tiev, B.B. (2003) Production of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assays for the herbicide butachlor, *Analytica Chimica Acta*, **491**, 1–13.
184. Ferreira, S.L.C., dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., Neto, B.B., Bos-que-Sendra, J.M. (2004) Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry. Review, *Talanta*, **63**, 1061–1067.
185. Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L. (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, **597**, 179–186.
186. Jeney, C., Dobay, O., Lengyel, A., Adám, É., Nász, I. (1999) Taguchi optimisation of ELISA procedures, *Journal of Immunological Methods*, **223**, 137–146.
187. Luo, W., Pla-Roca, M., Juncker, D. (2011) Taguchi design-based optimization of sandwich immunoassay microarrays for detecting breast cancer biomarkers, *Analytical Chemistry*, **83**, 5767–5774.
188. Avella-Oliver, M., Gimenez-Romero, D., Morais, S., González-Martínez, M. Á., Bueno, P. R., Puchades, R., Maquieira, A. (2013) INSEL: an in silico method for optimizing and exploring biorecognition assays, *Chemical Communications*, **49**, 10868–10870.
189. Joelsson, D., Moravec, P., Troutman, M., Pigeon, J., DePhillips, P. (2008) Optimizing ELISAs for precision and robustness using laboratory automation and statistical design of experiments, *Journal of Immunological Methods*, **337**, 35–41.
190. Rodbard, D., Lewald, J.E. (1970) Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data, *Acta Endocrinologica Supplementum (Copenhagen)*, **147**, 79–103.
191. Egan, E., Tiberghien, C., Dray, F. (1991) Practical methods for

- optimizing radioimmunoassay detection and precision limit, *Clinical Chemistry*, **37**, 226–230.
192. Choi, D.H., Katakura, Y., Matsuda, R., Hayashi, Y., Ninomiya, K., Shioya, S. (2007) Simulation model for predicting limit of detection and range of quantitation of competitive enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **103**, 427–431.
193. Karpinski, K.F. (1990) Optimality assessment in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Biometrics*, **46**, 381–390.
194. Hayashi, Y., Matsuda, R., Maitani, T., Imai, K., Nishimura, W., Ito, K., Maeda, M. (2004) Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA, *Analytical Chemistry*, **76**, 1295–1301.
195. He, X., Coombs, D., Myszkka, D.G., Goldstein, B. (2006) A theoretical and experimental study of competition between solution and surface receptors for ligand in a Biacore flow cell, *Bulletin of Mathematical Biology*, **68**, 1125–1150.
196. Barak-Shinar, D., Rosenfeld, M., Zisman, E., Abboud, S. (2000) A computational fluid dynamic model of antigen–antibody surface adsorption on a piezoelectric immunosensor, *Annals of Biomedical Engineering*, **28**, 565–571.
197. Barak-Shinar, D., Rosenfeld, M., Abboud, S. (2004) Numerical simulations of mass-transfer processes in 3D model of electrochemical sensor, *Journal of the Electrochemical Society*, **151**, H261–H266.
198. Sarraguça, J.M.G., Lopes, J.A., Santos, J.L., Lima, J.L. (2012) Mathematical simulation of signal profiles in flow analysis, *Analytical Letters*, **45**, 85–98.
199. Kolev, S.D. (1995) Mathematical modelling of flow-injection systems, *Analytica Chimica Acta*, **308**, 36–66.
200. Hage, D.S., Thomas, D.H., Chowdhuri, A.R., Clarke, W. (1999) Development of a theoretical model for chromatographic-based competitive binding immunoassays with simultaneous injection of sample and label, *Analytical Chemistry*, **71**, 2965–2975.
201. Ahmad, A.L., Low, S.C., Shukor, S.R.A., Fernando, W.J.N., Ismail, A. (2010) Hindered diffusion in lateral flow nitrocellulose membrane: Experimental and modeling studies, *Journal of Membrane Science*, **357**, 178–184.
202. Zeng, N., Wang, Z., Li, Y., Du, M., Liu, X. (2011) Inference of nonlinear state-space models for sandwich-type lateral flow immunoassay using extended Kalman filtering, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **58**, 1959–1966.
203. Fu, E., Nelson, K.E., Ramsey, S.A., Foley, J.O., Helton, K., Yager, P. (2009) Modeling of a competitive microfluidic heterogeneous immunoassay: sensitivity of the assay response to varying system parameters, *Analytical Chemistry*, **81**, 3407–3413.
204. Zeng, N., Wang, Z., Zhang, H., Alsaadi, F.E. (2016) A novel switching delayed PSO algorithm for estimating unknown parameters of lateral flow immunoassay, *Cognitive Computation*, **8**, 143–152.
205. Krishnamoorthy, S., Makhijani, V.B., Lei, M., Giridharan, M.G., Tisone, T. (2000) Computational studies of membrane-based test formats, In *Technical Proceedings 2000 International Conference on*

- Modeling and Simulation of Microsystems*, San Diego, 590–593.
206. Liu, Z., Hu, J., Li, A., Feng, S., Qu, Z., Xu, F. (2017) The effect of report particle properties on lateral flow assays: A mathematical model, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **248**, 699–707.