

ИММУНО-ПЦР: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

©2016 г. Д. Ю. РЯЗАНЦЕВ, Д. В. ВОРОНИНА,
С. К. ЗАВРИЕВ

*Институт биоорганической химии им. академикова
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва*

I. Введение. II. Особенности методологии иПЦР. III. Применение
иПЦР для детекции различных аналитов. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Метод иммуно-ПЦР (иПЦР) был впервые описан Сано в 1992 году [1]. Данный метод обладает преимуществами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА), что обеспечивает детекцию анализируемых веществ, присутствующих в исследуемых образцах в предельно низких концентрациях.

ПЦР с момента первой публикации в 1985 году [2] зарекомендовала себя как эффективный способ обнаружения малых количеств ДНК, вплоть до одной молекулы в реакционной пробирке [3, 4]. Благодаря высокой чувствительности ПЦР получила широкое распространение в клинической диагностике вирусных и бактериальных заболеваний, наследственных болезней, генетическом картировании и др. Но этот метод применим только для детекции нуклеиновых кислот, в то время как часто возникает необходимость высокочувствительного определения таких молекул, как гормоны, антитела, белки, токсины

Принятые сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; кПЦР – количественная ПЦР (ПЦР в «реальном времени»); иПЦР – иммуно-ПЦР; SMCC – сульфо-N-сукцинимидил 4-(малеидометил) циклогексанкарбоксилат; ДТТ – дитиотреитол; БОЕ – бляшкообразующая единица; СА – связывающие антитела; ДА – детектирующие антитела; бДА – биотинилированные детектирующее антитела; ЛСП – лигирование сближенных проб; ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией.

Адрес для корреспонденции: d.yu.ryazantsev@gmail.com, szavriev@ibch.ru

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00136) и стипендии Президента РФ СП-4413.2015.4.

и др., а не ДНК или РНК организма-продуцента. Для подобных целей применяют иммуноанализ (чаще всего ИФА): высокая специфичность антител в отношении антигенов позволяет идентифицировать широкий диапазон объектов, но с гораздо меньшей, чем ПЦР, чувствительностью. Однако для широкого спектра исследований необходим метод, обладающий чувствительностью ПЦР и возможностями ИФА.

Таким методом стала иПЦР, объединившая два вышеуказанных подхода – с ее помощью стала возможна высокочувствительная детекция широкого спектра аналитов. Принцип метода базируется на применении конъюгата антитело-ДНК с последующей амплификацией ДНК-метки. Первоначальный формат иПЦР, предложенный Сано [1], был основан на использовании в качестве линкера между антителом и ДНК химеры стрептавидин-белок А: стрептавидин связывает биотинилированную ДНК, а белок А – Fc-фрагмент иммуноглобулина G (IgG). Такой конъюгат ограничивает возможность применения этой методики только прямым форматом определения целевой молекулы (мало применяемым на практике), поскольку при проведении реакции в формате «сэндвич» белок А связывается с первичными антителами, что повышает уровень фонового сигнала [5]. Позднее был представлен другой тип конъюгата, состоящий из биотинилированного антитела, стрептавидина и биотинилированной ДНК-метки [6]. Преимуществами такого подхода являются его универсальность, возможность использования как в прямом и непрямом, так и «сэндвич» форматах иммуноанализа. Также применяется и ковалентное конъюгирование, где с помощью различных реагентов ДНК-метка присоединяется непосредственно к антителу [7]. Это уменьшает число этапов в протоколе, в результате чего снижается время проведения исследования и повышается соотношение сигнал/фон.

Как и ИФА, иПЦР можно проводить в различных форматах в зависимости от цели эксперимента. На рис. 1 приведены в сравнении типовые диапазоны определяемых концентраций в иПЦР и ИФА и представлены схемы основных вариантов проведения реакции: прямой, непрямой, «сэндвич», непрямой «сэндвич» и конкурентный. В прямом формате [7] антиген сорбируется на подложке и непосредственно детектируется конъюгированным антителом. В непрямом формате иммобилизованный антиген сначала образует комплекс со специфичными антителами, после чего используются антивидовые детектирующие антитела (ДА), конъюгированные с ДНК-меткой [8, 9]. Формат прямой «сэндвич» включает в себя детекцию антигена посредством двух типов антител: первичные антитела (связывающие антитела – СА) сорбируются на подложке и связывают

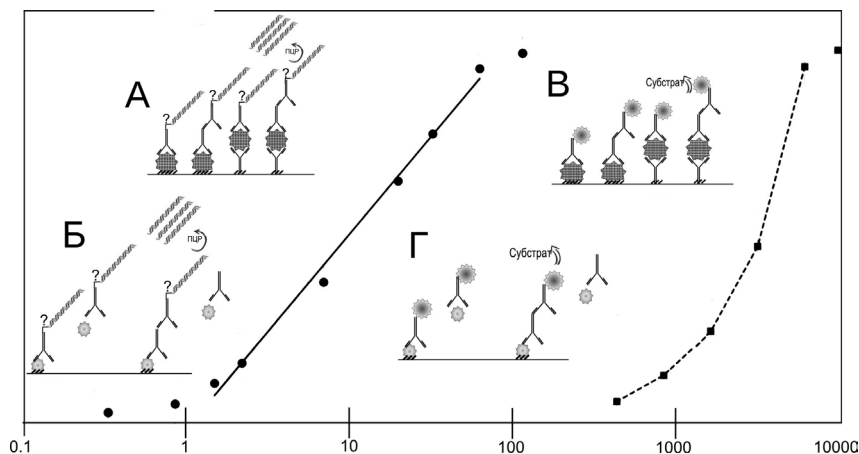


Рис. 1. Сравнение подходов и чувствительности иПЦР и ИФА.

Сплошная линия – иПЦР, прерывистая – ИФА.

Форматы иммуноанализа: (А, В) неконкурентный: прямой, непрямой, прямой «сэндвич», непрямой «сэндвич»; (Б, Г) конкурентный.

Подробное описание – в тексте.

аналит; вторичные антитела, конъюгированные с ДНК-меткой, являются детектирующими [10, 11]. Начальные этапы непрямого «сэндвич» анализа схожи с прямым «сэндвич», за исключением того, что вторичные антитела не несут ДНК-метку, а роль ДА играют третичные антитела [12, 13]. Конкурентный формат используют преимущественно для определения низкомолекулярных веществ [14–17]: к антигену (антителу), иммобилизованному на твердой фазе одновременно добавляется исследуемый материал, содержащий искомый антиген (антитело), и детектирующий конъюгат. В случае анализа антител для качественной оценки реакции применяют меченый антиген (редко), в анализе антигенов – меченые антитела. В данном обзоре рассматриваются только варианты конкурентного формата с мечеными антителами. Результат реакции обратно пропорционален количеству целевого анализата.

Определение ДНК-метки производится методом электрофореза или ПЦР в «реальном времени» (количественная ПЦР – кПЦР). В большинстве опубликованных работ предпочтение отдается последнему варианту, поскольку исключение этапа электрофореза позволяет существенно сократить время исследования, минимизировать контаминацию, оценить количество исходной матрицы и, как следствие,

аналита. В настоящей статье не рассматриваются работы в которых использовались другие способы амплификации ДНК.

Целью настоящего обзора является попытка осветить применение и основные аспекты развития метода иПЦР за последние 10 лет.

II. ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОЛОГИИ иПЦР

Один из вариантов универсальной методики постановки иПЦР подробно описан в статье [18], однако ввиду большой сложности метода следует подробно остановиться на его ключевых этапах. Высокая чувствительность метода ПЦР как способа детекции результатов в иПЦР является как основным преимуществом этого метода, так и его недостатком. Неспецифическая сорбция молекул антител, антигена или конъюгата ДНК-антитело приводит к некоторому уровню амплификации ДНК-метки во всех образцах (фоновый уровень). При этом основной задачей оптимизации метода иПЦР является увеличение отношения уровня амплификации в образцах, содержащих аналит, к уровню амплификации в образцах отрицательного контроля.

Во многих ранних работах описано полное отсутствие амплификации в образцах, не содержащих выявляемого аналита. Так, в статьях [7, 19–21] описаны результаты с отсутствием сигнала в отрицательных образцах при 25, 35, 40 и 52 циклах амплификации. Получить такой результат чрезвычайно сложно и в большинстве случаев невозможно, так как чувствительность метода ПЦР позволяет выявлять единичные молекулы ДНК в пробирке. Практически всегда наблюдается амплификация ДНК-метки в образцах отрицательного контроля на уровне 30–40 цикла, что, по-видимому, является следствием неспецифической сорбции компонентов, в том числе ДНК-метки [12, 22–24].

Отдельно стоит упомянуть проблему контаминации рабочей зоны и реактивов. Обязательно должны быть разнесены в пространстве зона, где проводится иммунохимическая часть работы, зона, где проводится работа с ДНК-меткой, и зона проведения кПЦР.

Таким образом, снижение фонового уровня является одним из ключевых этапов работы, связанных с оптимизацией и усовершенствованием метода иПЦР. В то же время одним из радикальных путей снижения фона может быть использование системы «лигирования сближенных проб» [25] (ЛСП, proximity ligation assay), которая будет рассмотрена ниже.

ВЫБОР НОСИТЕЛЯ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СОРБЦИЮ

В методах ИФА и ПЦР широкое распространение получило использование 96-луночных микропланшетов, что определило преобладание этого формата и в иПЦР. Требования, предъявляемые в иПЦР к характеристикам планшета, отличаются от таковых в ИФА и ПЦР. Материал должен обладать высокой антигенсвязывающей способностью и совместимостью с термоблоком амплификатора для того, чтобы избежать дополнительного этапа отщепления ДНК-метки от комплекса антиген-антитело и последующего ее переноса в другой планшет для амплификации.

Изначально для иПЦР использовали полипропиленовые микропланшеты, предназначенные для проведения ПЦР, но они не обеспечивали необходимой степени сорбции антигена [26, 27]. Позднее приобрели популярность поликарбонатные 8-луночные стрипы TopYield (Nunc) с улучшенной протеинсвязывающей способностью, специально разработанные для иПЦР [28–30]. Однако Барлетта [21] и Потукова [31] отмечают, что эксперименты, проведенные в стрипах TopYield, показывали низкую чувствительность. Выяснилось, что причиной этого является неравномерное распределение тепла в лунках во время проведения ПЦР из-за несоответствия формы лунок стрипов TopYield форме ячеек амплификатора. Проблема была решена путем оптимизации условий проведения ПЦР: повышение температуры денатурации [21] и удлинение стадии элонгации [31]. Еще один недостаток, связанный с формой стрипов TopYield, был выявлен при их использовании в кПЦР: по-видимому возникает несколько зон преломления и отражения света, что приводит к появлению на кривой ПЦР дополнительных ступеней, затрудняющих анализ результатов (это справедливо как минимум для амплификатора ДТ-96 (DTprime)). Также затруднительно использование стрипов TopYield без наслаивания поверх реакционной смеси минерального масла [32–34]. Несмотря на определенные недостатки, 8-луночные стрипы TopYield на сегодняшний день остаются наиболее популярным вариантом для иПЦР. Помимо стрипов TopYield авторы применяли поликарбонатные планшеты для ПЦР Corning Costar 6511 и Greiner Thermoquick polycarbonate plate 651570. При использовании этих планшетов получаются результаты, сходные с результатами, полученными на Nunc TopYield. Форма кривых ПЦР при использовании этих планшетов была близка к идеальной сигмоиде, благодаря чему нет выпадения отдельных лунок эксперимента. Также специально для иПЦР разработаны поликарбонатные планшеты с повышенной сорбцией Robostrips (Roboscreen®), имеющие форму стандартных 0,2 мл стрипов для ПЦР,

что обеспечивает их плотное прилегание к лункам амплификатора и равномерное распределение тепла [21], они лишены недостатков стрипов TopYield, но в них может быть затруднительно проводить промывки автоматическими вошерами.

Ряд авторов предлагают ферментативное или термическое отщепление ДНК от антитела и последующий перенос части смеси в пробирку для ПЦР [9, 35] или же проведение нескольких циклов ПЦР в стрипах TopYield с последующим переносом части смеси в планшет для кПЦР [21].

Альтернативным способом сенсбилизации антител является использование различных микрочастиц (подробно описано ниже в разделе «Использование наноструктур в иПЦР»).

СПОСОБЫ КОНЬЮГИРОВАНИЯ АНТИТЕЛА И ДНК-МЕТКИ

Принципиальное отличие иПЦР от ИФА состоит в использовании амплификации ДНК как способа количественного определения анализа; для этого необходимо синтезировать конъюгат антитела с ДНК-меткой (рис. 2).

В оригинальном формате иПЦР [1] химера стрептавидин-белок А обеспечивала два сайта связывания: стрептавидин связывался с биотинилированной ДНК, а белок А связывал Fc-фрагмент иммуноглобулина G (IgG). Такой линкер имеет ряд недостатков. Во-первых, применение этой методики ограничено исключительно прямым форматом иммуноанализа [5]. Во-вторых, аффинность белка А сильно различается в зависимости от класса/подкласса и видовой принадлежности антител, что снижает универсальность метода [36]. В других ранних работах по иПЦР [37] в качестве линкера использовали авидин – тетрамерный белок, обладающий высокой аффинностью и специфичностью к биотину. Из-за тетрамерной структуры авидин может образовывать различные конъюгаты, что отражается в снижении чувствительности и воспроизводимости результатов. В отличие от авидина, у стрептавидина отсутствует углеводный фрагмент и низкая изоэлектрическая точка ($pI=5$, тогда как у авидина $pI=10$), что в конечном итоге приводит к уменьшению неспецифического связывания [38].

Конъюгаты на основе взаимодействия биотин–стрептавидин

Чжоу с коллегами [6] предложили способ конъюгации антитела и ДНК *in situ* (рис. 2А). Его суть состоит в последовательном добавлении в пробирку бДА, стрептавидина и биотинилированной ДНК. Подобный комплекс может быть использован в любом формате иПЦР: прямом, непрямом или «сэндвич», в связи с чем он получил название «универсальный иПЦР» [39]. Несмотря на все положительные

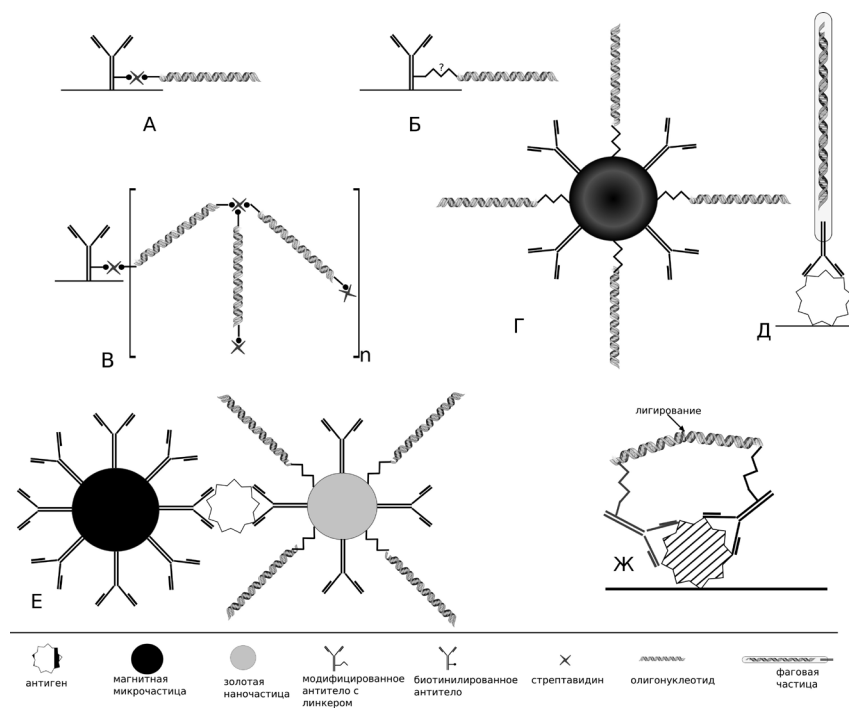


Рис. 2. Способы конъюгации антитела и ДНК-метки.

А – связывание биотинилированного антитела и биотинилированного олигонуклеотида посредством стрептавидина.

Б – ковалентное конъюгирование, основанное на использовании гетеробифункционального линкера, который реагирует с разными функциональными группами ДНК (с введенной искусственно реакционной группой, такой как SH-, NH₂- и др.) и антитела.

В – надмолекулярный комплекс биотинилированного антитела и бисбиотинилированной ДНК-метки.

Д – фаговый дисплей – на поверхности рекомбинантного бактериофага M13 экспонируется фрагмент антитела, в роли сигнальной ДНК выступает ДНК фага.

Е – биобаркодинг (biobarcode assay) – магнитные частицы несут на себе СА, а золотые – ДА и ДНК-метку.

Ж – метод «лигирования сближенных проб» – после связывания ЛСП-зондов с соседними эпитопами, молекулы ДНК находятся в непосредственной близости друг от друга и под действием лигазы, соединяющей два олигонуклеотида, образуют новую нить ДНК, которая может амплифицироваться.

свойства, использование стрептавидин-биотинового конъюгата не лишено недостатков: требуется большое количество длительных промывок, необходимых для предотвращения неспецифического связывания, что увеличивает время проведения реакции; трудно подбирать оптимальное стехиометрическое соотношение реагентов. Для обеспечения полного связывания система на каждой стадии инкубации должна достичь термодинамического равновесия, что требует подбора оптимального времени проведения каждого этапа. В большинстве протоколов иПЦР время инкубации ограничено 1 часом. За это время гетерогенная система может не достигнуть состояния равновесия, в результате чего снижается количество комплексов и интенсивность сигнала [40].

Надо отметить, что при использовании стрептавидин-биотинилированного конъюгата преимущественно предлагается использовать олигонуклеотид, биотинилированный с одного конца. Кристоф Нимейер[28] впервые описал надмолекулярные комплексы, формируемые из биотинилированных с двух концов фрагментов двухцепочечной ДНК, стрептавидина и антител (рис. 2В). Использование подобных надмолекулярных комплексов позволяет усилить специфический сигнал за счет того, что на одну молекулу ДА приходятся десятки, а то и сотни молекул ДНК-метки; кроме этого важно, что такая система универсальна. Нами была усовершенствована методика получения комплексов на основе относительно коротких (60–70 н.) одноцепочечных олигонуклеотидов, биотинилированных с 5'- и 3'- концов и стрептавидина [32, 34]. Для снижения уровня неспецифического сигнала при применении стрептавидин-биотиновых комплексов можно уменьшить количество этапов, если использовать предварительно синтезированные и очищенные конъюгаты биотинилированного антитела/ДНК или меченного стрептавидином антитела/ДНК. Помимо прочего, подготовка комплекса антитело-стрептавидин занимает меньше времени, чем биотинилирование антитела [41].

Ковалентные конъюгаты

Еще одним эффективным способом конъюгации является ковалентное связывание ДА и ДНК (рис. 2Б). Обычно используется гетеробифункциональный сшивающий агент, содержащий две реакционные группы, которые реагируют с разными субстратами: ДНК (с введенной искусственно реакционной группой, такой как SH-, NH₂- и др.) и аминогруппой антитела, связывая их между собой. Распространена схема ковалентной конъюгации ДНК и антитела с использованием N-сукцинимидил 4-(малеидометил) циклогексанкарбоксилата (SMCC) в качестве связывающего линкера (рис. 3). В этом случае может быть использована ДНК-метка, несущая тиоловую группу

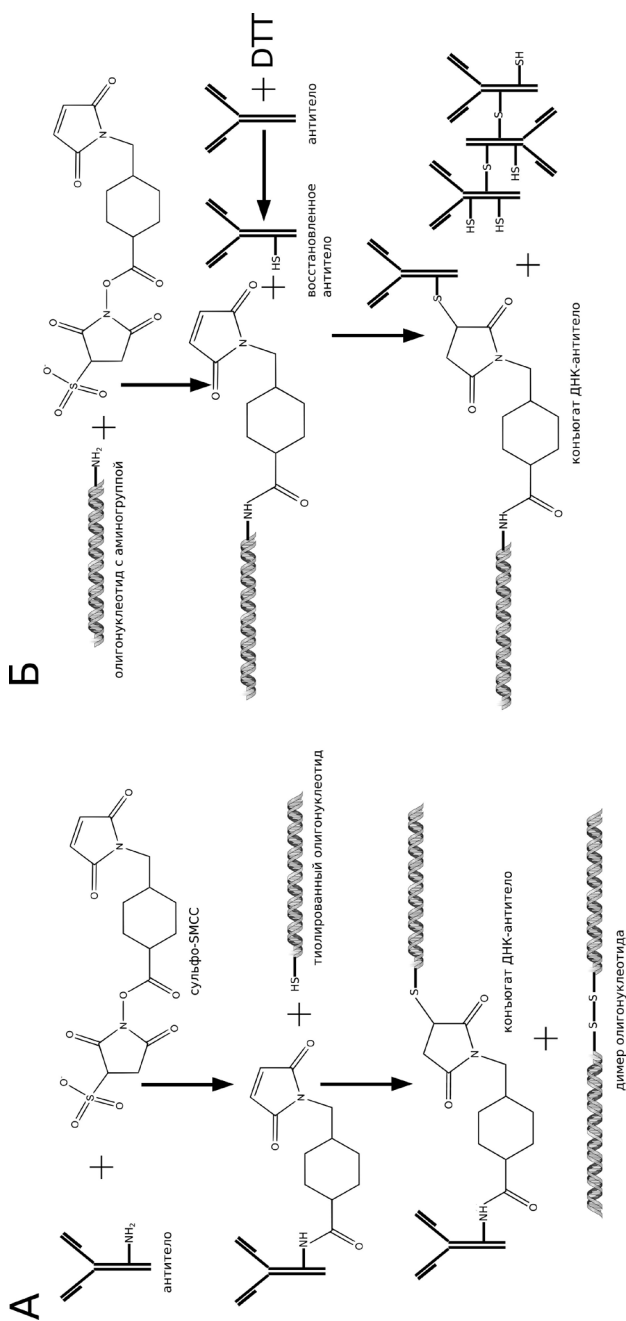


Рис. 3. Схемы ковалентной конъюгации при помощи N-сукцинимидил 4-(малеимометил) циклогексанкарбоксилата.

А – с использованием тиолированной ДНК-метки.

Б – с использованием ДНК-метки с введенной аминогруппой.

Выделяют два основных этапа: 1) присоединение линкера сульфо-SMCC к NH_2 -группе антител; 2) связывание активированного антитела с тиолированной ДНК-меткой и образование финального конъюгата. При использовании ДНК-метки с искусственно введенной аминогруппой добавляется дополнительный шаг: восстановление дисульфидных связей антитела восстанавливающими агентами, такими как ДТТ и др. [62], N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом [44, 46], трис-(2-карбок-сизтил)-фосфин гидрохлорид [45].

и NH_2 -группы молекулы антитела [42], или SH-группа антител и аминогруппа ДНК [43–46]. Как один из вариантов данной реакции, Вейссleder с соавт. предложили применение фотоотщепляемого бифункционального агента, что имеет преимущество для определения клеточных белков в единичных живых клетках, так как зачастую условия поведения амплификации ДНК несовместимы с клеточной средой [47].

К сожалению, в литературе приведено мало сведений о выходе целевого конъюгата, процедуре очистки, в том числе от побочных продуктов реакции: димера олигонуклеотида при использовании тиолированного олигонуклеотида, а также агрегатов восстановленных молекул антител с образованием дисульфидных мостиков. Для очистки предлагается использовать метод гель-фильтрации под высоким давлением [7], позволяющий отделить целевой конъюгат от непрореагировавших антител или олигонуклеотида, но очистить конъюгат от побочных продуктов реакции таким способом невозможно. В статье Хашимото с соавт. [48] описана конъюгация антитела с ДНК посредством гидразона через бензальдегид-модифицированный 5'-конец ДНК.

Описана функционализация антитела посредством введения генетически кодируемой неприродной аминокислоты (п-ацетилфенилаланина или п-азидофенилаланина) в рекомбинантное антитело [49]. Олигонуклеотид, несущий тиольную группу модифицируют аминокси-малеимидным линкером, конъюгация осуществляется по аминокси-группе олигонуклеотида и модифицированной аминокислоте.

Многообещающим методом получения конъюгатов является ряд методов, известных под названием «клик» («click chemistry»), таких как реакция азид-алкинового циклоприсоединения, реакция [4+2]-циклоприсоединения диенофилов и сопряжённых диенов (реакция Дильса-Альдерса с обратными электронными требованиями) и др. [50]. По опыту авторов использование реакции азид-алкинового присоединения с применением в качестве катализатора одновалентной меди может приводить к преципитации антитела, более перспективно использование реакции промотируемой напряженностью циклооктинового цикла или реакции [4+2]-циклоприсоединения диенофилов и сопряжённых диенов («безмедный клик») [51]. В статье [51] описано получение конъюгата антитело-ДНК с использованием нескольких модифицирующих агентов. По аминогруппе антитела через сукцинимидный эфир вводится тетразин; в азидированный олигонуклеотид посредством реакции циклоприсоединения азидов и алкинов вводится транс-циклооктен, далее в фосфатном буфере

проводится конъюгация по типу реакции [4+2]-циклоприсоединения диенофилов и сопряжённых диенов.

Так же как и стрептавидин-биотиновые, ковалентные конъюгаты подходят для всех форматов иПЦР. Предварительная подготовка конъюгатов ДНК-антитело упрощает проведение реакции, при этом отпадает необходимость в ряде инкубационных этапов и снижается степень неспецифического связывания реагентов [38]. В настоящее время стали коммерчески доступны готовые к использованию ковалентные конъюгаты (Imperacer®, Chimera Biotec) или наборы для их изготовления (Thunder-Link®, Innova Biosciences; Imperacer®, Chimera Biotec). Компания Chimera Biotec представляет конъюгаты антитело–ДНК, имеющие разнообразную специфичность. Например, антибиотиновый конъюгат, который может использоваться как третичное антитело, специфичное в отношении биотинилированного ДА [52, 53], или антидигоксигениновый конъюгат [13]. Помимо этого Chimera Biotec изготавливает на заказ конъюгаты с необходимой заказчику специфичностью: антиротавирусные [54], против таубелка [55] и др. Таким образом, исследователи освобождаются от длительной и трудоемкой подготовки комплекса антитело–ДНК, а в случае с готовыми конъюгатами отпадает необходимость в оптимизации его синтеза и очистке. Использование ковалентных конъюгатов позволяет еще больше снизить время анализа (даже по сравнению с «собранными» заранее биотин-стрептавидиновыми комплексами).

Отдельно следует описать метод ЛСП (рис. 2Ж), технологию, использующую «двойное узнавание целевой молекулы» для детекции белков, белок-белковых взаимодействий и посттрансляционных модификаций [56]. Два антитела, специфичные к разным эпитопам одного антигена и меченные различными ДНК-метками, называются ЛСП-зондами. После связывания зондов с соседними эпитопами молекулы ДНК находятся в непосредственной близости друг от друга и могут гибридизироваться. При добавлении лигазы происходит сшивка разрыва между двумя цепями и вновь образованная нить ДНК может быть амплифицирована с праймерами, подобранными на исходно отдельные цепи. Данный метод обладает высокой чувствительностью за счет того, что уровень фонового сигнала предельно низок, так как вероятность случайной встречи и лигирования двух молекул ДНК, при данных условиях, чрезвычайно низка [25, 57, 58].

Помимо взаимодействия антиген-антитело, при приготовлении конъюгатов для иПЦР используют специфичные взаимодействия других объектов, например, такие как ганглиозид GM1-холерный токсин и Tus-Тег взаимодействие. Белок Tus – терминатор репликации

прокариот – стабильно связывает специфические последовательности ДНК Ter. В работе Шаффер и соавт. [59, 60] применяли комплекс Tus-Ter в детекции антител. Для этого они объединяли конструкцию Tus-Ter с такими иммуноглобулинсвязывающими белками, как стрептококковый протеин G и стафилококковый протеин A [60], или антивидовыми антителами [59]. Протокол Tus-Ter-lock иПЦР включает минимальное число промывок, что дает ему преимущество перед «универсальной иПЦР» с стрептавидин-биотиновыми конъюгатами. Также, по мнению авторов, ковалентное связывание антитела и ДНК-метки технически более сложная задача, а, следовательно, не может быть легко адаптирована для применения в диагностических лабораториях, в отличие от комплекса Tus-Ter.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОСТРУКТУР В иПЦР

Способы проведения иПЦР не ограничиваются простой комбинацией ИФА и ПЦР. В последние годы в дизайн иПЦР активно внедряются нанотехнологии, в частности, использование магнитных и золотых наночастиц, липосом, вирусных частиц.

Магнитные или золотые наночастицы используют для представления СА или ДА совместно с ДНК-меткой. Возможность применения магнитных наночастиц, покрытых полистиролом, в качестве носителя СА в своих работах показали Барлетта [10] и Ли [61]. Такая модификация метода иПЦР используется для снижения эффекта влияния других компонентов пробы (эффект «матрикса»): после короткого периода инкубации антигена и ДА с магнитными частицами, несущей СА, не связавшиеся компоненты удаляют, а магнитные частицы ресуспендируют и подвергают дальнейшим манипуляциям. Ряд других авторов осуществляли эксперименты на основе золотых магнитных частиц, функция которых была аналогична наночастицам, покрытым полистиролом [43, 62].

Описано использование бифункциональных наночастиц, золотых или магнитных, покрытых ДА и ДНК-меткой (рис. 2Г). По данным Никитиной с соавт. [63], в изучаемой ими системе нет негативного влияния на афинность антитела, в отличие от ковалентного связывания ДНК и антитела. Преимуществом метода также является возможность связывания с частицами нескольких антител, специфичных к разным эпитопам [64]. Если сравнивать конъюгат на основе наночастиц с другими конъюгатами, то для производства бифункциональных частиц требуется больше времени, чем для подготовки биотинилированных антител, но прямое конъюгирование антител и ДНК-метки в значительной мере сложнее [31]. Несомненно, на поверхности частиц

помещается большее количество ДНК-меток [11], чем при непосредственном связывании с антителом, что отражается в усилении сигнала в иПЦР при использовании наночастиц [65].

В технологии биобаркодинга (biobarcode assay) используются одновременно магнитные микрочастицы и золотые наночастицы (рис. 2Е). Магнитные частицы покрывают СА, а золотые – ДА и ДНК-меткой. Анализ проводится в формате «сэндвич», образующиеся при этом иммунокомплексы подвергают магнитной сепарации, после чего от золотых наночастиц отщепляют ДНК-метку для дальнейшего анализа. Оригинальный формат биобаркодинга, разработанный Миркиным с соавт. [66, 67], предусматривал сканометрический метод анализа. Отщепленную ДНК осаждают на стеклянных чипах, покрытых олигонуклеотидом, комплементарным половине ДНК-метки. После вносят золотые наночастицы, покрытые серебром (I) и модифицированные ДНК, комплементарной другой половине ДНК-метки. При наличии в исходном растворе «штрих-кода» – ДНК-метки она связывается с олигонуклеотидом и наночастицами; добавляют раствор, восстанавливающий серебро, и регистрируют результат. В отличие от вышеописанного метода, в иПЦР биобаркодинге ДНК-метка детектируется при помощи кПЦР [67–70]. Биобаркодинг представляет собой многообещающий метод также благодаря возможности мультиплексного анализа, т.е. одновременного определения нескольких аналитов в одном образце, поскольку наночастицы, покрытые отдельными ДА, могут быть «закодированы» олигонуклеотидами с уникальной последовательностью.

Мэйсон с соавторами [71] описали необычный формат иПЦР, в котором как детектирующий агент использовали липосому с заключенными внутрь липидного бислоя молекулами ДНК и встроенным рецептором моносиалоганглиозида GM. Ганглиозид высокоспецифично взаимодействует с холерным токсином, а также является сайтом связывания для некоторых других соединений. После связывания такой конструкции с антигеном липосому подвергали лизису и детектировали высвобождающуюся ДНК-метку. Согласно авторам статьи, детектирующая структура на основе липосомы имеет преимущества перед стандартной иПЦР. Во-первых, каждая липосома вмещает до 60 молекул ДНК, что увеличивает чувствительность метода. Во-вторых, при добавлении ДНКазы непосредственно перед лизисом липосом можно снизить контаминацию лунок планшета, так как фермент не проникает через липидный бислой.

В качестве носителя ДА и ДНК-метки применяют также вирусные частицы: опосредованная фаговым дисплеем иПЦР впервые была

описана Чжаном и соавт. [72] в 2006 году (рис. 2Д). Эта методика объединяет преимущества иПЦР и фагового дисплея. На поверхности рекомбинантного бактериофага M13 экспонируется фрагмент антигена [73, 74] или белок, специфично взаимодействующий с определяемым агентом [75], а в роли ДНК-метки выступает фаговая ДНК. Использование фаговых частиц в иПЦР избавляет от сложной и длительной подготовки конъюгата антигена-ДНК в стандартной иПЦР.

БЛОКИРОВКА ВАКАНТНЫХ САЙТОВ СОРБЦИИ

Одним из способов решения проблемы неспецифического связывания компонентов и снижения фонового сигнала является выбор подходящего блокирующего реагента для покрытия поверхности планшета и добавления в буферные растворы. Приемлемый для конкретного исследования блокирующий агент подбирается в процессе оптимизации методики иПЦР. Широкое распространение получили такие соединения, как бычий сывороточный альбумин [14, 31, 67], казеин [75–77], обезжиренное молоко [9, 11, 78], ДНК из молока лосося [54] или тимуса телят [78] и нормальная козья сыворотка [79]. Материал для забивки также добавляют на стадии инкубации с ДА или сыворотками [35, 78].

ДЕТЕКЦИЯ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

В иПЦР существует два подхода при амплификации сигнальной ДНК. Первый – осуществление всего процесса в одной пробирке. Такая методика требует тщательного подбора материала планшета, поскольку он должен эффективно связывать антиген или антиген, а также быть термостабильным и подходить для проведения ПЦР [80]. Другой подход заключается в отщеплении ДНК-метки от иммунного комплекса и переносе ее в пробирку для ПЦР. Основными способами отщепления сигнальной ДНК являются включение сайта рестрикции в ДНК-метку или нагрев до 95–100 °С, при котором комплекс антигена-ДНК денатурирует и ДНК-метка высвобождается [81, 82].

Представляет интерес и обнаруженное Хэ с коллегами [41, 80] 1000-кратное снижение чувствительности иПЦР при осуществлении ее в одной пробирке по сравнению с иПЦР, проведенной с отщепляемой ДНК-меткой. Авторы предполагают, что причиной тому служит негативное влияние компонентов ИФА на проведение амплификации.

На сегодняшний день существует два наиболее распространенных варианта оценки результата иПЦР: электрофорез в агарозном геле и кПЦР. С увеличением числа образцов гель-электрофорез становится

громоздким и длительным. Кроме того, он является источником контаминации рабочей зоны продуктами ПЦР, что может привести к ложноположительным результатам. Часто недостаточно простой идентификации наличия или отсутствия аналита в пробе необходимо количественное определение содержания связавшейся ДНК-метки, уровень которой коррелирует с количеством исследуемого аналита. В кПЦР в реакционную смесь добавляется интеркалирующий флуоресцентный краситель или «гидролизуемый» зонд (известный как TaqMan®). Зонд несет флуорофор и тушителю флуоресценции, в ходе ПЦР он отжигается на ДНК-метку и в процессе реакции разрушается Taq-полимерзой, в результате чего флуорофор и тушитель разделяются. В ходе кПЦР происходит измерение уровня флуоресценции каждый цикл реакции. Номер цикла, на котором уровень флуоресценции превышает базовый, обратно пропорционален количеству ДНК-метки в лунке. Следовательно, можно использовать кПЦР для точного количественного анализа исходной матрицы. Данный подход уменьшает количество манипуляций, проводимых с образцом, время проведения анализа и минимизирует риск контаминации, особенно при осуществлении всех этапов исследования в одной пробирке, что делает кПЦР главным методом для анализа результатов иПЦР.

Для обработки и представления результатов после завершения кПЦР вычисляют величину порогового цикла (Cq) – первый цикл ПЦР, на котором уровень флуоресценции от расщепленного зонда начинает превышать базовый порог флуоресценции (эти расчеты проводятся в программе, поставляемой с амплификатором). Для наглядного представления результатов можно использовать следующую схему [18]. Для всех проб из общего числа циклов амплификации вычитают значения пороговых циклов, затем по этим величинам рассчитывают средние значения и стандартные отклонения. Рассчитывают граничное значение (ГЗ) по формуле $ГЗ = [\text{среднее}(40 - Cq)_{\text{без аналита}} + 3 * \text{Стандартное отклонение}(40 - Cq)_{\text{без аналита}}]$ и нормированные значения (ΔCq) по формуле $\Delta Cq_{(\text{обр})} = [(Cq)_{\text{объект}} - ГЗ]$. Пробы с нормированным значением меньше или равным нулю считаются отрицательными, а со значением больше нуля положительными. В различных экспериментах можно сравнивать только нормированные значения [18]. Для установления количества искомого вещества в образце строят стандартную кривую, используя регрессионный анализ значений Ct от log значения известных концентраций аналита.

III. ПРИМЕНЕНИЕ иПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ АНАЛИТОВ

Очевидно, что иПЦР, обладающая чувствительностью ПЦР и гибкостью ИФА, может быть использована для определения самого широкого спектра анализатов: от вирусных и бактериальных антигенов до лекарственных средств и токсинов небелковой природы. В таблице суммированы краткие данные об анализируемых объектах, чувствительности метода иПЦР, в том числе в сравнении с ИФА, формате иммуноанализа и типе используемого конъюгата. В данном разделе будут рассмотрены некоторые сложности, связанные со специфичностью структуры и/или выделения определенных объектов, и способы их преодоления; проведено сравнение обнаружения одного анализата с помощью различных методик иПЦР. Остановимся на некоторых наиболее характерных и интересных примерах для каждой из групп анализатов, определяемых методом иПЦР.

Вирусные белки являются одной из самых распространённых «мишеней» для иПЦР, так как, учитывая патогенез большинства вирусных инфекций, на ранних стадиях заболевания реплицируется предельно малое количество вирионов. Таким образом, высокочувствительные методы играют исключительную роль в ранней диагностике вирусных заболеваний, а также в контроле за эффективностью противовирусной терапии.

Ранняя диагностика очень важна для выявления вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). В течение острой фазы ВИЧ-инфекции, которая длится до 1 месяца, в крови больного не определяются специфические антитела, однако обнаруживается РНК вируса, из чего следует, что основным способом диагностики ВИЧ в продромальном периоде является ПЦР с обратной транскрипцией. Наиболее выдающиеся результаты удалось получить при помощи иПЦР Барлетте с соавторами [10]: предел обнаружения антигена р24, компонента капсида ВИЧ-1 в этом исследовании составил всего 10–100 молекул на реакцию, что соответствует менее чем 1 вириону (один вирион ВИЧ-1 содержит примерно 1200–3000 молекул белка р24). Для сравнения, предел обнаружения ВИЧ в ПЦР – около половины вириона (геном ВИЧ-1 состоит из двух молекул РНК), фактически же предел обнаружения в ПЦР с обратной транскрипцией составляет 50 вирионов/мл [83].

Детекция аденовирусов в образцах кала была описана у Бонот с соавт. [77]. Обычно определение аденовирусов производится методом кПЦР. Выделение и очистка нуклеиновых кислот – необходимый и в то же время критический этап ПЦР, на котором может происходить

Таблица. Чувствительность детекции иПЦР для разных объектов*

Объект	Предел обнаружения М × раз чувствительнее ИФА	Формат иммуноана- лиза/тип конъюгата	Источ- ник
1	2	3	4
1. Вирусные антигены			
p24 антиген ВИЧ-1	10–100 p24 молекул на реакцию (0,33–3,3 фг/мл) 1,14×10 ⁻¹⁸ 3000	сэндвич (первичные антитела были сорбированы на магнитные частицы) / биотинилированные антитела	[10]
Коровий антиген вируса гепатита В (HBcAg)	10 нг HBcAg (10 ⁸ БОЕ)/мл 4,8×10 ⁻¹⁰ 10000	Прямой / фаговый дисплей	[75]
Белок нуклеокапсида вируса Хантаан	10 фг/мл 2×10 ⁻¹⁶ 10 ⁸	сэндвич/бифункциональные наночастицы	[11]
Аденовирусы HAdV-2 и HAdV-41	Для HAdV-2 – 50 копий генома на реакцию – 200 Для HAdV-41 – 90 копий генома на реакцию – 200	прямой/биотинилированные антитела	[77]
Инактивированные ротавирусные частицы – антиген VP6	100 вирусных частиц/мл – 1000	сэндвич/ковалентный	[54]
Вирус птичьего гриппа H5N1	1/10000 от дозы 50%-ной инфекционности для куриных эмбрионов/мл – 1000	прямой/ковалентный	[96]
Капсидный белок норовируса (рекомбинантные вирусоподобные частицы Норуолк – rNVLPs)	100 rNVLPs/лунка (10 фг) – 1000	непрямой сэндвич/биотинилированные антитела (линкер – авидин)	[12]
Норовирусы (rNVLPs)	10 ⁵ rNVLPs/мл – 1000	сэндвич/биотинилированные антитела	[86]
Поверхностный белок респираторно-синцициального вируса	4,1 БОЕ/мл – 1000	сэндвич/биобаркодинг	[67]
Вирус ящура типа О	10 фг/мл – 10 ⁷	прямой/бифункциональные наночастицы	[64]
Капсидный белок VP7 вируса синего языка овец	0,1 фг/мл 2,78×10 ⁻¹⁷ 10 ⁷	сэндвич/биобаркодинг	[68]

Продолжение табл. см. на сл. стр.

* Для удобства сравнения, чувствительность приведена в двух единицах измерения, сначала как она дана в исходной статье, а затем в пересчете в моль/л (для тех случаев, когда детектировали отдельные молекулы, а не целые клетки или вирионов).

«—» – чувствительность авторами статьи не определялась или ее невозможно рассчитать, «?» – нет прямого сравнения ИФА и иПЦР.

Продолжение табл.

1	2	3	4
2. Опухлеассоциированные антигены и факторы роста			
MG7-антиген	10 молекул антигена на клетках MKN45 – 1000	непрямой/биотинилированные антитела	[97]
Эпидермальноподобный фактор роста домен 7 (EGFL7) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	EGFL7 – 0,51 пМ (14 пг/мл) – 16	сэндвич/ковалентный	[46]
	VEGF – 0,0033 пМ (0,125 пг/мл) – 8		
3. Белковые факторы, ассоциированные с болезнями			
Бета-амилоид	0,03 фемтомоль/лунка – 3	сэндвич/ковалентный	[48]
Тау-белок, фосфорилированная τ-версия	2 пг/мл $3,6 \times 10^{-14}$?	непрямой сэндвич/ковалентный	[13]
Изоформы тау-белка 3R и 4R	10 пг/мл $1,8 \times 10^{-13}$?	сэндвич/ковалентный	[55]
Тау-белок	5 пг/мл 9×10^{-14} 30	сэндвич/бифункциональные наночастицы	[98]
Интерлейкин-3 (ИЛ-3) и фактор стволовых клеток (SCF)	ИЛ-3 – 0,01 нг/мл $5,8 \times 10^{-15}$ 100	сэндвич/биотинилированные антитела, бифункциональные наночастицы	[31]
	SCF – 0,01 нг/мл $5,4 \times 10^{-15}$ 100		
Нормальная форма прионного белка, нейронспецифическая энолаза, глиальный фибриллярный кислый белок	– Относительная чувствительность и ПЦР выше в 100 раз	непрямой/биотинилированные антитела	[9]
Прионы скреппи	1 фг/мл 2×10^{-14} 10^6	сэндвич/биотинилированные антитела	[99]
Прионы скреппи	$2,32 \times 10^2$ эпитопов – 1000	сэндвич/ковалентный	[100]
Богатый гистидином белок 2 <i>Plasmodium falciparum</i> (PfHRP-2)	0,1 пг/лунка $5,7 \times 10^{-13}$?	сэндвич/ковалентный	[81]
Антигены <i>Yersinia pestis</i>	– – ?	непрямой/ковалентный	[101]
4. Гормоны			
Рекомбинантный пропептид миостатина и рекомбинантный фоллистатин	Для пропептида миостатина – 2,4 пг/мл $8,6 \times 10^{-14}$?	сэндвич/ковалентный	[102]
	Для фоллистатина – 40 пг/мл $1,14 \times 10^{-12}$?		
17 бета-эстрадиол	0,058 нг/мл 2×10^{-10} 170	сэндвич/фаговый дисплей	[103]

Продолжение табл. см. на сл. стр.

Продолжение табл.

1	2	3	4
5. Токсины (в том числе и небелковой природы)			
Ботулинический анатоксин типа А и В	Для анатоксина типа А – 4,5 пг/реакция в натрий-фосфатном буфере (9 пг/реакция в молоке) $1,7 \times 10^{-12}$ 200;	сэндвич/биотинилированные антитела	[87]
	Для анатоксина типа В – 18,5 пг/реакция в PBS (37 пг/реакция в молоке) $3,7 \times 10^{-12}$ 50		
В-субъединица холерного токсина и ботулотоксин типа А	65–300 молекул/мл в деионизированной воде $1,3 \times 10^{-16}$?	сэндвич/липосомальный (+ вместо ДА – GM1 рецептор–моносиалоганглиозид)	[71]
Ботулинический токсин А, токсин тканевого шока золотистого стафилококка, холерный эндотоксин	Для ботулинического токсина А – 1 пг/мл $1,9 \times 10^{-14}$ /300	сэндвич/биотинилированные антитела (+ комплекс ДНК–стрептавидин)	[32, 33]
	Для токсина тканевого шока золотистого стафилококка – 0,1 пг/мл $4,2 \times 10^{-15}$ 2000		
	Для холерного эндотоксина – 1 пг/мл 10^{-13} 200		
Шига-токсин 2	0,1 пг/мл в PBS $1,4 \times 10^{-15}$ 10000	сэндвич/стрептавидин-антитело	[41]
	0,01 пг/мл в молоке $2,56 \times 10^{-13}$ 100		[90]
Стафилококковый энтеротоксин типа Н	4,5 пг/мл в формате сэндвич $1,8 \times 10^{-12}$ 250, в непрямом формате – 1,2 нг/мл $4,8 \times 10^{-11}$ 125	сэндвич, непрямой/стрептавидин-антитело	[104]
Афлатоксин В1	0,15 нг/мл 4×10^{-10} ?	сэндвич (+ первичные антитела сорбированы на магнитных частицах)/ковалентный	[45]
Афлатоксин	0,02 нг/мл $6,4 \times 10^{-11}$ 4	конкурентный/фаговый дисплей	[73]
Охратоксин А	3,7 фг/мл 9×10^{-15} 5	конкурентный / фаговый дисплей	[74]
Рицин	10 пг/мл в куриных яйцах и образцах молока $1,5 \times 10^{-13}$ 10, 100 пг/мл в экстрактах говяжьего фарша $1,5 \times 10^{-12}$ 100	сэндвич, прямой/стрептавидин-антитело	[80]
	1 пг/мл $1,5 \times 10^{-14}$ 10000		

Окончание табл. см. на сл. стр.

Окончание табл.

1	2	3	4
Вегетативный инсектицидный белок	1 нг/мл $1,5 \times 10^{-11}$ 10	сэндвич/биотинилированные антитела	[105]
Трансгенный Cγ1Ab белок	100 пг/мл $7,7 \times 10^{-13}$ 10	сэндвич/биотинилированные антитела	[106]
3,4,3',4'-тетрахлорбифенил	1,72 пг/л $5,9 \times 10^{-15}$ 30000	непрямой/бифункциональные наночастицы	[69]
	1,5 фг/мл 5×10^{-15} 100	конкурентный/биотинилированные антитела (линкер – авидин)	[93]
Полихлорированные бифенилы – Арохлор 1248	2,55 пг/л $8,7 \times 10^{-15}$ 10000	прямой/бифункциональные наночастицы	[70]
Трис-(2, 3-дибромпропил)-изоцианурат	0,97 пг/л $1,3 \times 10^{-14}$ 600	непрямой/бифункциональные наночастицы	[107]
Диэтилфталат	1,06 пг/л $6,1 \times 10^{-15}$ 2000	прямой/бифункциональные наночастицы	[108]
Хлорамфеникол	0,0008 мкг/л $2,5 \times 10^{-12}$ В 2 раза чувствительнее прямого и непрямого ИФА, в 10 раз чувствительнее коммерческого набора для ИФА.	конкурентный/бифункциональные наночастицы	[17]
6. Лекарственные средства			
Авискумин	100 пг/мл $1,75 \times 10^{-12}$ 1000–10000	сэндвич/ковалентный	[30]
7. Антитела			
IgE, специфичные для аллергенов 5 группы <i>Blomia tropicalis</i> и аллергенов 1 и 2 группы <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	187,5 пг/мл $9,8 \times 10^{-13}$ 100	сэндвич/биотинилированные антитела	[78]
IgG, специфичные для паротита	–	непрямой/ковалентный	[35]
Тропомииозин-специфичные IgE	1,2 пМ – ?	сэндвич/Tus–Ter–lock	[59]
IgG человека	33 нг/мл 2×10^{-13} 30	Tus–Ter–lock (химеры [Tus и IgG-связывающий белок G] или [Tus + химера IgG-связывающих белков G и L – LG])	[60]
Антилекарственные антитела (анти рецептор- IgG1 слитый белок антитела)	40 пг/мл – 1500	сэндвич/ковалентный	[94]
IgM, специфичные для антигена II фазы <i>Coxiella burnetii</i>	– / ?	непрямой/ковалентный	[48]

потеря анализата. К тому же в образцах кала присутствуют ингибиторы Таq-полимеразы, что затрудняет диагностику и приводит к ложноотрицательным результатам. Для проведения иПЦР нет необходимости выделять ДНК, а ингибиторы удаляются в результате большого количества промывок. При сравнении кПЦР с иПЦР частота выявления аденовирусов в образцах кала возросла с 9,5 до 59%.

Ротавирусы являются причиной тяжёлой диареи у детей, для заражения достаточно 10 вирусных частиц [84]. Адлер с соавт. [50] предложили иПЦР в качестве метода диагностики ротавирусной инфекции в образцах кала. Несмотря на описанные выше преимущества иПЦР перед кПЦР при анализе кала, чувствительность иПЦР, описанная Адлером [50], оказалась аналогичной пределу обнаружения ротавирусных частиц в ОТ-ПЦР, описанной ранее [85], – 100 вирусных частиц/мл (вероятно, отсутствие повышения чувствительности является следствием использования разных образцов для анализа: в случае иПЦР – образцы кала, ОТ-ПЦР – пробы воды).

Норовирусы – возбудители sporadических и эпидемических желудочно-кишечных заболеваний. Род Норовирусы включает множество штаммов, что затрудняет подбор праймеров для ПЦР, осложняя диагностику заболевания. В свою очередь, ИФА не обеспечивает достаточной чувствительности их детекции. В 2006 году Тиан и Мандрелл [12] сообщили о применении иПЦР в обнаружении норовирусов в образцах кала и пищевых продуктов на примере норовирусных вирусоподобных частиц. С помощью количественной иПЦР возможно определить 100 очищенных вирусоподобных частиц. При детекции норовирусов в образцах кала чувствительность иПЦР оказалась в 10 раз выше, чем в ПЦР. Мацушита с соавторами [86] в 2013 году также на примере норовирусных вирусоподобных частиц использовали иПЦР для определения норовирусов в образцах воды.

Определение белков и пептидов, играющих главную роль в патогенезе некоторых заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, прионные болезни и др., также требует высокочувствительного метода анализа для точной и ранней постановки диагноза. Несмотря на не до конца выясненный патогенез болезни Альцгеймера, роль триггера отводится агрегации бета-амилоида и гиперфосфорилированию тау-белка [13, 47]. Низкая концентрация тау-белка в цереброспинальной жидкости (100–2000 пг/мл) ограничивает возможность использования ИФА для диагностики болезни Альцгеймера. Предложенный Сингер с соавт. [13] вариант иПЦР позволяет определять 2 пг/мл тау-белка в ликворе, используя непрямой «сэндвич» формат.

В отличие от вирусных и бактериальных заболеваний, диагностировать которые при помощи ПЦР можно благодаря присутствию возбудителя в биологических образцах и возможности выделения из них ДНК/РНК, наличие токсинов и их уровень напрямую не коррелирует с присутствием возбудителя, что делает метод иПЦР уникальным для высокочувствительного определения токсинов в исследуемом образце. Описаны подходы иПЦР для диагностики бактериальных, растительных и микотоксинов, в основном в образцах пищевых продуктов, что важно для мониторинга их качества с целью предотвращения отравлений.

Ботулотоксин – сильнейший из органических токсинов, вырабатывается анаэробной бактерией *Clostridium botulinum*. Ботулотоксин типа А детектировали Мэйсон и соавторы [71] при помощи разработанного ими метода липосомальной иПЦР: ДНК-метки инкапсулировали внутри липидного бислоя липосомы, в который был встроен рецептор моносиалоганглиозида GM1. Потенциально использование ганглиозидного рецептора возможно при определении не только токсинов ботулизма и холеры, но и коклюша, столбняка, рицина, шига-токсина и термолабильного энтеротоксина. Авторы заявляют уровень детекции ботулотоксина в деионизированной воде 12 ± 4 молекул или 0,02 фг/мл. Нижний предел определяемой концентрации зависит от аффинности СА и рецептора ганглиозида к биотоксину. За связывание с антигенной детерминантой с ганглиозидом не должны конкурировать СА. Именно поэтому поликлональные АТ более эффективны в качестве СА, в отличие от моноклональных, конкурирующих с ганглиозидным рецептором (по неопубликованным данным, упомянутым в статье [71] для рицина).

Применение иПЦР в определении ботулинического нейротоксина было исследовано в работе Андрея с соавт. [87]. В качестве модели для эксперимента использовали ботулинические анатоксины типа А и В. Чувствительность, определенная для анатоксина А в натрий-фосфатном буфере (PBS), составила 90 пг/мл. В данном случае сравнительно низкую чувствительность авторы объясняют использованием анатоксина. Однако эти показатели находятся в диапазоне стандартного метода обнаружения и идентификации ботулинических нейротоксинов – внутрибрюшинных инъекций в организм мышей с пределом обнаружения в 10 пг для ботулотоксина типа А [88, 89]. Исследование ботулинического токсина типа А в полужирном молоке показало предел обнаружения 3,75 пг/мл, что в 20 раз ниже, чем в реакции с анатоксином. Ботулинический анатоксин типа В определяли в концентрации 370 пг/мл в PBS и 750 пг/мл в полужирном молоке.

Наиболее распространенной причиной пищевой токсикоинфекции у людей является группа шига-токсинов, продуцируемых *Escherichia coli*. Шига-токсин типа 2 считается главной причиной гемолитико-уремического синдрома и других изменений, вызываемых в организме шига-токсинами. Описанный Хе с соавт. [90] метод иПЦР обладает чувствительностью 0,1 пг/мл при определении токсина в PBS и 0,01 пг/мл для образцов молока. По-видимому, разница в чувствительности объясняется использованием в первом случае коммерческих антител, а во втором – полученных авторами и более тщательно отобранных моноклональных антител.

Хе с соавт. [80] определяли в образцах куриных яиц, молока и говяжьего фарша рицин – чрезвычайно токсичный белок растительного происхождения, содержащийся в клещевине. Эксперимент показал, что чувствительность формата «сэндвич» выше, чем прямой иПЦР, также наилучший результат был достигнут при использовании поликлональных антител как в качестве СА, так и ДА, что, возможно, снижало кросс-реактивность и неспецифическое взаимодействие между парами различных антител. В другой работе содержание рицина детектировали в образцах сыворотки и фекалий мышей [91], используя, как описано выше, поликлональные антитела для связывания и детекции рицина. Схожие методики анализа показали сопоставимые результаты предела обнаружения: 10-100 пг/мл в образцах яиц, молока, фарша против 1 пг/мл в сыворотке и фекалиях мышей.

Ниже приведены работы, описывающие детекцию методом иПЦР не только белковых токсинов, но и токсинов небелковой природы, а также органических соединений, являющихся опасными загрязнителями окружающей среды.

Афлатоксин – канцерогенный микотоксин, продуцируемый некоторыми грибами рода аспергилл (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* и др.), попадает в пищевую цепь в результате заражения грибами продовольственного зерна и кормов. Иммуномагнитная иПЦР была разработана Бабу и Муриана [45] в качестве подхода для детекции афлатоксина В₁. Было проведено несколько вариантов реакции с различным порядком связывания антител и антигена с поли-/моноклональными антителами. Наилучший результат (пороговый цикл – 33,9) показали моноклональные антитела в непрямом связывании (антитела сорбируются на магнитные частицы после связывания с антигеном), однако и наихудший (40,1) результат также был продемонстрирован для моноклональных антител, но в прямом связывании (сначала происходит сорбция антител на магнитные частицы, после – взаимодействие с антигеном). Авторы предполагают, что при свя-

зывании моноклональных антител с протеином G теряется их антигенсвязывающая способность из-за пространственных затруднений.

Лей и соавт. описывают определение афлатоксина на основе использования технологии фагового дисплея [73]. Фаг M13 содержал антиидиотипическое нано-антитело к афлатоксину и ДНК-метку. В данном исследовании авторы столкнулись с некоторыми трудностями, связанными с выделением токсина из образцов зерна и комбикормов. Афлатоксины выделяются из образцов посредством обработки растворами с высокой концентрацией метанола, так как они имеют низкую растворимость в воде, в результате снижается активность антител и, как следствие, чувствительность. Авторы подобрали оптимальную концентрацию метанола для эффективного выделения афлатоксина и поддержания высокой чувствительности. Дополнительно при анализе образцов кукурузы, риса, комбикорма матричный эффект устраняли добавлением 3% BSA, а образцов арахиса – 0,05% Tween 20.

Полихлорированные бифенилы – группа органических соединений, входящая в список стойких органических загрязнителей, определенных Стокгольмской конвенцией [92]. Они широко распространены в окружающей среде и могут включаться в пищевые цепи. Янг с соавт. с соавт. [69] разработала методы детекции таких веществ, используя золотые наночастицы в качестве носителя антитела и ДНК-метки, где роль ДА выполняли моноклональные антитела, а также другой подход – конкурентную ИПЦР, в которой применялись биотинилированные поликлональные антитела с авидином в качестве линкера между сигнальной ДНК и антителом [93]. Последний эксперимент показал чувствительность на 3 порядка ниже.

Другая область, в которой нашел применение метод ИПЦР, – детекция антител. Несмотря на то, что это возможно и с использованием классических иммунологических методов, в данной сфере есть исключения. Например, определение аллерген-специфичных IgE обычно проводят методом кожных тестов, что, в свою очередь, не всегда возможно, или прибегают к классическим методам иммуноанализа. Нередки ситуации, когда кожные тесты положительны, а иммуноанализ (чаще всего используется метод с использованием тест-полосок) отрицателен, что свидетельствует о некоторых ограничениях возможностей иммуноанализа. Как показала работа Ли с соавт. [78], в которой изучали IgE, специфичные для аллергенов 5 группы *Blomia tropicalis* и аллергенов 1 и 2 групп *Dermatophagoides pteronyssinus*, ИПЦР является надежным методом для определения специфичных IgE в сыворотках с пределом обнаружения 200 пг/мл.

Джонстон с соавт. [63, 64] предложили систему Tus-Ter-lock и ПЦР для определения IgG человека и тропомиозин-специфических IgE, которая показала чувствительность равную 1,2 пМ (180 пг/мл). Это значение схоже с пределом обнаружения метода ImmunoCAP – широко распространенным коммерческим тестом, обеспечивающим качественное и количественное определение IgE. Однако авторы сообщают о том, что их подход имеет возможность одновременной детекции нескольких аллергенов и мог бы стать более дешевой и простой альтернативной платформой для профилирования аллергенов, чем представленные сегодня методы, основанные на использовании микрочипов.

Применение терапевтических белков в лечении различных заболеваний может вызывать иммунный ответ и выработку антител, снижающих или нивелирующих действие препарата. Таким образом, для безопасной и эффективной терапии необходим контроль содержания антител к терапевтическим белкам в клинических образцах. Джани с коллегами [94] сравнили три разных подхода для оценки иммунной реакции: ИФА, метод электрохемилюминесценции (ЭХЛ) и иПЦР. Все эксперименты выполняли в формате «сэндвич». Роль ДА в ИФА выполняли моноклональные АТ, конъюгированные с пероксидазой хрена, детекция ферментной метки осуществлялась по измерению оптической плотности после добавления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. В методе ЭХЛ ДА представлены конъюгированными с рутением IgG. Наблюдалась корреляция между результатами, полученными в ИФА и иПЦР. Вместе с тем, с помощью иПЦР были идентифицированы как положительные те образцы, которые в ИФА определялись как отрицательные. Чувствительность иПЦР в данном исследовании превысила в 1500 раз чувствительность ИФА и в 500 раз чувствительность ЭХЛ.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод иПЦР применяют уже почти 25 лет, но широкую популярность он приобрел у исследователей лишь с 2009 года (рис. 4), общее число публикаций по этому методу в мире не очень велико: около 400.

Чувствительность метода складывается из множества факторов, и нам не удалось выявить значительного превышения уровня чувствительности в экспериментах с ковалентными конъюгатами по сравнению с биотинилированными антителами; уровень чувствительности, по-видимому, прежде всего определяется свойствами антитела. При использовании ковалентных конъюгатов антител-

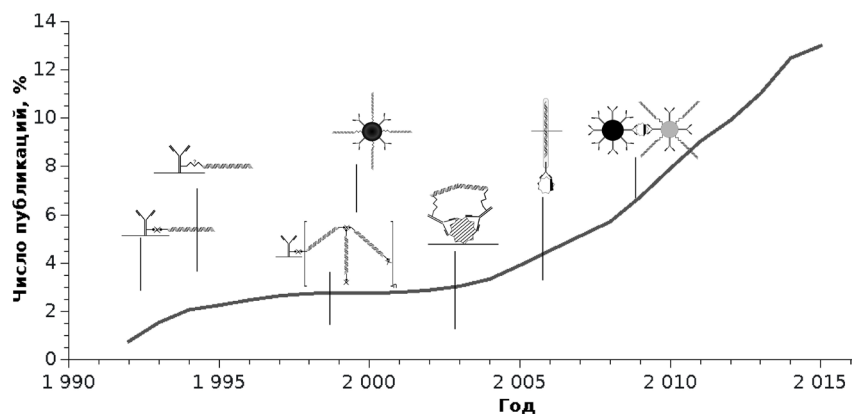


Рис. 4. Динамика числа публикаций с момента первого описания иПЦР. Отмечены даты появления основных типов конъюгатов.

ДНК чувствительность не поднимается выше 10^{-14} моль/л, вероятно, из-за снижения аффинности антител [63]. В практике авторов был случай, когда из 6 пар биотинилированных антител к стафилококковым токсинам, имеющих сходные низкие константы аффинности и показывающих сходные результаты по уровню фона и чувствительности в ИФА, в иПЦР высокий уровень чувствительности показали только 3 пары (неопубликованные данные).

Большая часть работ (35%) выполнена с биотин-стрептавидиновыми конъюгатами, в то время как наиболее впечатляющие по чувствительности результаты получены при использовании бифункциональных наночастиц и системы биобаркодинга (до 0,1 фг/мл или $1,14 \times 10^{-18}$ моль/л), однако предел обнаружения в диапазоне 10^{-16} – 10^{-15} моль/л наблюдается и в других способах проведения иПЦР, в том числе при использовании биотинилированных антител на наночастицах [31], липосом [71], фагового дисплея [15]. Некоторые исследователи отмечают небольшое превышение чувствительности метода по сравнению с ИФА (менее 10 раз) [46, 48, 74].

Метод иПЦР обладает рядом недостатков. В основном это длительность и сложность оптимизации метода и проведения анализа. Реализация высокой потенциальной чувствительности метода требует высокого уровня экспериментальной работы. В протоколе эксперимента предусматривается около 20 промывок (в работе Малу [52] практиковалась 31 промывка в автоматическом вошере),

около половины которых приходится на стадию после инкубации с реагентом, содержащим ДНК-метку [18, 21], суммарно протокол может занимать от 26 часов [35] до 2 дней [18]. Представляется перспективным уменьшение времени проведения анализа за счет исключения этапа иммобилизации антигена/первичных антител (в зависимости от вида иммуноанализа) на планшете. Это достигается путем использования магнитных частиц с ковалентно связанными СА или технологии биобаркодинга. Также время проведения анализа можно снизить за счет использования предварительно собранных комплексов биотинилированной ДНК, стрептавидина и биотинилированного антитела или использования ковалентных конъюгатов. В будущем сокращение длительности анализа возможно при автоматизации исследования. Сообщается, что применение одних только автоматических вошеров снижает разброс результатов и увеличивает воспроизводимость [48]. Одним из путей дальнейшего развития метода может являться создание роботизированной станции для проведения полного цикла иПЦР.

Несмотря на отмеченные недостатки, преимущество иПЦР неоспоримо: это высокая чувствительность и широкий диапазон определяемых концентраций (несколько порядков) [10, 64, 75]. Важным преимуществом иПЦР перед ИФА является возможность обнаружения антигена в малом количестве образца (в том числе при его существенном разведении для снижения влияния «эффекта матрикса»), что существенно в исследовании пищевых продуктов [80, 95], педиатрии (где порой не представляется возможным получить достаточный объем исследуемого материала) и других областях. Так как для проведения реакции достаточен небольшой объем исследуемого материала, возможна подготовка большего числа аликвот для повторного и более точного анализа. Не менее значимо высокочувствительное мультиплексное определение веществ (аналита) в предельно малых концентрациях [7], в том числе в системе биобаркодинга [67–80]. Иммуно-ПЦР, сочетающая в себе достоинства ИФА и ПЦР, преодолевает ограничения этих методов. Опираясь на мощный потенциал иПЦР, мы можем предполагать более широкое распространение этого метода по мере дальнейшего усовершенствования, оптимизации и упрощения протокола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sano, T., Smith, C.L., Cantor, C.R. (1992) Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates, *Science*, **258**, 120–122.
2. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **230**, 1350–1354.
3. Nakamura, S., Katamine, S., Yamamoto, T., Fong, S.K., Kurata T., Hirabayashi Y., Shimada K., Hino S., Miyamoto T. (1993) Amplification and detection of a single molecule of human immunodeficiency virus RNA, *Virus Genes*, **7**, 325–338.
4. Li, H., Cui, X., Arnheim, N. (1990) Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4580–4584.
5. Sano, T. Response, *Science*, **260**, 699.
6. Zhou, H., Fisher, R.J., Papas, T.S. (1993) Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 6038–6039.
7. Hendrickson, E.R., Truby, T.M., Joerger, R.D., Majarian, W.R., Ebersole, R.C. (1995) High sensitivity multi-analyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 522–529.
8. Wang, T., Lu, H., Lou, P., Lin, F.H. (2008) Application of highly sensitive, modified glass substrate-based immuno-PCR on the early detection of nasopharyngeal carcinoma, *Biomaterials*, **29**, 4447–4454.
9. Kuczius, T., Becker, K., Fischer, A., Zhang, W. (2012) Simultaneous detection of three CNS indicator proteins in complex suspensions using a single immuno-PCR protocol, *Anal. Biochem.*, **431**, 4–10.
10. Barletta, J., Bartolome, A., Constantine, N. (2009) Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion, *J. Virol. Methods*, **157**, 122–132.
11. Chen, L., Wei, H., Guo, Y., Cui, Z., Zhang, Z., Zhang, X.E. (2009) Gold nanoparticle enhanced immuno-PCR for ultrasensitive detection of Hantaan virus nucleocapsid protein., *J. Immunol. Methods*, **346**, 64–70.
12. Tian, P., Mandrell, R. (2006) Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method, *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 564–574.
13. Singer, D., Soininen, H., Alafuzoff, I., Hoffmann, R. (2009) Immuno-PCR-based quantification of multiple phosphorylated tau-epitopes linked to Alzheimer's disease, *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 2263–2267.
14. Dan, B., Huisheng, Zh., Guangxin, Y., Xianyin, P. (2015) A real-time immuno-PCR assay for the detection of tetrabromobisphenol A., *Anal. Methods*, **7**, 99–106.
15. Zhuang, H.S., Zhou, C. (2009) Determination of anthracene by real-time immuno-polymerase chain reaction assay., *Anal. Chim. Acta.*, **633(2)**, 278–282
16. Meng, X.Y., Li, Y.S., Zhou, Y., Zhang, Y.Y., Qiao, B., Sun, Y., Yang, L., Hu, P., Lu, S.Y., Ren, H.L., Zhang, J.H., Wang, X.R., Liu, Z.S. (2015) Real-time immuno-PCR for ultrasensitive detection of pyrene and other homologous PAHs., *Biosens. Bioelectron.*, **70**, 42–47.
17. Tao, X., He, Z., Cao, X., Shen, J., Li, H. (2014) Development of a highly sensitive real-time immuno-PCR for the measurement of chloramphenicol in milk based on magnetic bead capturing, *Anal. Methods*, **6**, 9340–9347.

18. Niemeyer, C.M., Adler, M., Wacker, R. (2007) Detecting antigens by quantitative immuno-PCR, *Nature Protocols*, **2**, 1918–1930.
19. Liang, H., Cordova, S.E., Kieft, T.L., Rogelj, S. (2003). A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A Streptococcus, *J. Immunol. Methods*, **279**, 101–110.
20. Chao, H.Y., Wang, Y.C., Tang, S.S., Liu, H.W. (2004) A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for Clostridium botulinum neurotoxin type A, *Toxicon*, **43**, 27–34.
21. Barletta, J., (2006) Applications of real-time immuno-polymerase chain (rt-IPCR) for the rapid diagnoses of viral antigens and pathologic proteins, *Mol. Aspects Med.*, **27**, 224–253.
22. Fischer, A., von Eiff, C., Kuczus, T., Omoe, K., Peters, G., Becker, K. (2007). A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Mol. Med. (Berl)*, **85**, 461–469.
23. Niemeyer, C.M., Wacker, R., Adler M. (2003). Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA–protein conjugates, *Nucleic Acids Res.*, **31**, e90.
24. Pinzani, P., Lind, K., Malentacchi, F., Nesi, G., Salvianti, F., Villari, D., Kubista, M., Pazzagli, M., Orlando, C. (2008) Prostate-specific antigen mRNA and protein levels in laser microdissected cells of human prostate measured by real-time reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction and immuno-quantitative polymerase chain reaction, *Hum. Pathol.*, **39**, 1474–1482.
25. Gullberg, M., Gústafsdóttir, S., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegård, M., Betsholtz, C., Landegren, U., Fredriksson, S. (2004) Cytokine detection by antibody-based proximity ligation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8420–8424.
26. Case, M., Burt, A., Hughes, J. et al. (1999) Enhanced ultrasensitive detection of structurally diverse antigens using a single immuno-PCR assay protocol, *J. Immunol. Methods*, **223**, 93–106.
27. Numata, Y., Matsumoto, Y. (1997) Rapid detection of alpha-human atrial natriuretic peptide in plasma by a sensitive immuno-PCR sandwich assay. *Clin. Chim. Acta.*, **259**, 169–176.
28. Niemeyer, C.M., Adler, M., Pignataro, B., Lenhart, S., Gao, S., Lifeng, C., Fuchs, H., Dietmar, B. (1999) Selfassembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4553–4561.
29. Saito, K., Kobayashi, D., Sasaki, M., Araake, H., Kida, T., Yagihashi, A., Yajima, T., Kameshima, H., Watanabe, N. (1999) Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay, *Clin. Chem.*, **45**, 665–669.
30. Adler, M., Langer, M., Witthohn, K., Eck, J., Blohm, D., Niemeyer, C.M. (2003) Detection of rViscumin in plasma samples by immuno-PCR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 757–763.
31. Potůčková, L., Franko, F., Bambousková, M., Draber, P. (2011) Rapid and sensitive detection of cytokines using functionalized gold nanoparticle-based immuno-PCR, comparison with immuno-PCR and ELISA, *J. Immunol. Methods*, **371**, 38–47.
32. Ryazantsev, D.Yu., Petrova, E.E., Kalinina, N.A., Valyakina, T.I., Grishin, E.V., Zavriev, S.K. (2012) Application of supramolecular DNA-streptavidin complexes for ultrasensitive detection of several toxins by immuno-PCR, *Global Journal of Analytical Chemistry*, **3**, e17.
33. Ryazantsev, D.Yu., Zavriev S.K. (2011) Immuno-PCR: application of DNA-streptavidin supramolecular

- complexes for hypersensitive detection of antigens, *FEBS Journal*, **238**, 161–162.
34. Maerle, A.V., Ryazantsev, D.Yu., Dmitrenko, O.A., Petrova, E.E., Komaleva, R.L., Sergeeva, I.V., Trofimov, D.Yu., and Zavriev, S.K. (2014) Detection of *Staphylococcus aureus* Toxins Using Immuno-PCR. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **40**, 526–531.
35. McKie, A.A., Samuel, D., Cohen, B., Saunders, N.A. (2002) A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG, *J. Immunol. Methods*, **270**, 135–41.
36. Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 559p.
37. Ruzicka, V., März, W., Russ, A., Gross, W. (1993) Immuno-PCR with a commercially available avidin system., *Science*, **260**, 698–699.
38. Malou, N., Raoult, D. (2011) Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies, *Trends in microbiology*, **19**, 295–302.
39. Niemeyer, C.M., Adler, M., Wacker, R. (2005) Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification, *Trends Biotechnol.*, **23**, 208–216.
40. Crowther, J.R. (1995) *ELISA: Theory and Practice*, Humana Press. Inc.
41. He, X., Qi, W., Quiñones, B., McMahon, S., Cooley, M., Mandrell, R.E. (2011) Sensitive detection of Shiga Toxin 2 and some of its variants in environmental samples by a novel immuno-PCR assay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3558–3564.
42. Sims, P.W., Vasser, M., Wong, W.L., Williams, P.M., Meng Y-J.G. (2000) Immunopolymerase Chain Reaction Using Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection, *Analytical Biochemistry*, **281**, 230–232.
43. Deng, M., Xiao, X., Ji, X., Sun, T., Wu, Z.X., Zheng, X.L., Wang, Q., Zhu, L.H. (2014) Immuno-PCR for Detection of *Giardia lamblia* Cy in Water, *J. AOAC Int.*, **97**, 561–566.
44. Allen, R., Rogelj, S., Cordova, S., Kieft, T.L., (2006) An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin, *J. Immunol. Methods*, **205**, 364–367.
45. Babu, D., Muriana, P. (2011) Immunomagnetic bead-based recovery and real time quantitative PCR (RT iq-PCR) for sensitive quantification of aflatoxin B(1), *J. Microbiol. Methods*, **86**, 188–194.
46. Zhang, J., Vernes, J., Ni, J., Nelson, C., Wong, A., Chen, S.T., Asundi, A., Vandlen, R., Meng, Y.G. (2014) Real-time immuno-polymerase chain reaction in a 384-well format: detection of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor-like domain 7, *Anal. Biochem.*, **463**, 61–66.
47. Agasti, S.S., Liong, M., Peterson, V. M., Lee, H. & Weissleder, R. (2012) Photocleavable DNA barcode-antibody conjugates allow sensitive and multiplexed protein analysis in single cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 18499–18502.
48. Hashimoto, M., Aoki, M., Winblad, B., Tjernberg, L.O. (2012) A novel approach for A β 1–40 quantification using immuno-PCR, *J. Neurosci. Methods*, **205**, 364–367.
49. Kazane, S., Sok, D., Cho, E.H., Uson, M.L., Kuhn, P., Schultz, P.G., Smider, V.V. (2012) Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3731–3736.
50. Spicer, C.D., Davis, B.G. (2014) Selective chemical protein modification. *Nat. Commun.*, **5**, 4740.
51. van Buggenum, J.A., Gerlach, J.P., Eising, S., Schoonen, L., van Eijl, R.A., Tanis, S.E., Hogeweg, M.,

- Hubner, N.C., van Hest, J.C., Bonger, K.M., Mulder, K.W. (2016) A covalent and cleavable antibody-DNA conjugation strategy for sensitive protein detection via immuno-PCR, *Sci. Rep.*, **6**, 22675.
52. Malou, N., Renvoise, A., Nappez, C., Raoult, D. (2012) Immuno-PCR for the early serological diagnosis of acute infectious diseases: the Q fever paradigm, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 1951–1960.
53. Spengler, M., Adler, M., Jonas, A., Niemeyer, C.M. (2009) Immuno-PCR assays for immunogenicity testing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**, 278–282.
54. Adler, M., Schulz, S., Fisher, R., Niemeyer, C.M. (2005) Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR (“Imperacer”) method with endpoint and real-time detection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 1289–1294.
55. Luk, C., Compta, Y., Magdalinou, N., Marti, M.J., Hondhamuni, G., Zetterberg, H., Blennow, K., Constantinescu, R., Pijnenburg, Y., Mollenhauer, B., et al., (2012) Development and assessment of sensitive immuno-PCR assays for the quantification of cerebrospinal fluid three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies, *J. Neurochem.*, **123**, 396–405.
56. Söderberg, O., Gullberg, M.; Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hygbring, P. Bahram, F., Larsson, L.-G., et al., (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation, *Nature Methods*, **3**, 995–1000.
57. Gehwolf, R., Band, E., Trost, A., Iglseider, B., Trinkka, E., Haschke-Becher, E., Kraus, J., Harrer, A. (2014) TaqManR Proximity ligation technology for the detection of heterodimeric adhesion receptors on lymphocytes, *J. Immunol. Methods.*, **404**, 81–86.
58. Jiang, X., Cheng, S., Chen, W., Wang, L., Shi, F., Zhu, C. (2012) Comparison of oligonucleotide-labeled antibody probe assays for prostate-specific antigen detection, *Anal. Biochem.*, **424**, 1–7.
59. Johnston, E., Kamath, S., Lopata, A., Schaeffer, P.M. (2014) Tus-Ter-lock immuno-PCR assays for the sensitive detection of tropomyosin-specific IgE antibodies, *Bioanalysis*, **6**, 465–476.
60. Morin, I., Askin, S.P., Schaeffer, P.M. (2011) IgG-detection devices for the Tus-Ter-lock immuno-PCR diagnostic platform, *Analyt.*, **136**, 4815–4821.
61. Li, Z., Wang, X., Chang, J., Xie, W.B., Liu, T.F., Zhang, Q.L., Deng, Y.J., Ding, Y.Q. (2012) The establishment of supramolecular immunobead real-time PCR and the identification of Cox-2 as a metastasis-related marker in colorectal carcinoma, *Oncol. Rep.*, **28**, 977–984.
62. Deng, M., Long, L., Xiao, X., Wu, Z., Zhang, F., Zhang, Y., Zheng, X., Xin, X., Wang, Q., Wu, D. (2011) Immuno-PCR for one step detection of H5N1 avian influenza virus and Newcastle disease virus using magnetic gold particles as carriers, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **141**, 183–189.
63. Nikitina, I., Sabirova, E., Solopova, O., Surzhikov, S.A., Grineva, E.N., Karpov, V.L., Lisitsyn, N.A., Beresten, S.F. (2014) A New ImmunoPCR Format for Serological Diagnosis of Colon Cancer, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **48**, 117–123.
64. Ding, Y., Liu, Y., Zhou, J., Chen, H.T., Zhang, J., Ma, L.N., Wei, G. (2011) A highly sensitive detection for foot-and-mouth disease virus by gold nanoparticle improved immuno-PCR, *Virol. J.*, **8**, 148.

65. Nam, J.M., Thaxton, C.S., Mirkin, C.A. (2003) Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, *Science*, **301**, 1884–1886.
66. Nam J.M., Park S.J., Mirkin C.A. (2002) Bio-barcodes based on oligonucleotide-modified nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3820–3821.
67. Perez, J., Vargis, E., Russ, P., Haselton, F.R., Wright, D.W. (2011) Detection of respiratory syncytial virus using nanoparticle amplified immuno-polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.*, **410**, 141–148.
68. Yin, H., Jia, M., Shi, L., Yang, S., Zhang, L.Y., Zhang, Q.M., Wang, S.Q., Li, G., Zhang, J.G. (2011) Nanoparticle-based bio-barcode assay for the detection of bluetongue virus, *J. Virol. Methods*, **178**, 225–228.
69. Yang, G., Zhuang, H., Chen, H.Y., Ping, X.Y., Bu, D. (2014) A sensitive immunosorbent bio-barcode assay based on real-time immuno-PCR for detecting 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 1693–1700.
70. Yang, G., Zhuang, H., Chen, H., Ping, X., Bu, D. (2015) A gold nanoparticle based immunosorbent bio-barcode assay combined with real-time immuno-PCR for the detection of polychlorinated biphenyls, *Sens. Actuator B-Chem.*, **214**, 152–158.
71. Mason, J., Xu, L., Sheng, Z., He, J., O'Leary, T.J. (2006) Liposome polymerase chain reaction assay for the sub-attomolar detection of cholera toxin and botulinum neurotoxin type A, *Nat. Protoc.*, **1**, 2003–2011.
72. Guo, Y., Zhou, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Qiao, Y., Bi, L., Wen, J., Liang, M., Zhang, J. (2006) Phage display mediated immuno-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **34**, e62.
73. Lei, J., Li, P., Zhang, Q., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, X., Zang, W. (2014) An anti-idiotypic nanobody-phage based real-time immuno-PCR for detection of hepatocarcinogen aflatoxin in grains and feedstuffs, *Anal. Chem.*, **86**, 10841–10846.
74. Liu, X., Xu, Y., Xiong, Y., Tu, Z., Li, Y.P., He, Z.Y., Qiu, Y.L., Fu, J.H., Gee, S.J., Hammock B.D. (2014) VHH phage-based competitive real-time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochratoxin A in cereal, *Anal. Chem.*, **86**, 7471–7477.
75. Monjezi, R., Tan, S., Tey, B., Sieo, C.C., Tan, W.S. (2013) Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR, *J. Virol. Methods*, **187**, 121–126.
76. Kasai, N., Kobayashi, K., Shioya, S., Yoshikawa, Y., Yotsumoto, F., Miyamoto, S., Mekada, E., Enokizono, J. (2012) Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer, *Am. J. Transl. Res.*, **4**, 415–421.
77. Bonot, S., Ogorzaly, L., El Moulidj, B., Zorzi, W., Cauchie, H.M. (2014) Detection of small amounts of human adenoviruses in stools: comparison of a new immuno real-time PCR assay with classical tools, *Clin. Microbiol. Infect.*, **20**, O1010–O1016.
78. Lee, K., Hur, B., Chua, K., Kuo, I., Song, S., Cha, S. (2008) Detection of Serum IgE Specific to Mite Allergens by Immuno-PCR, *Immune Network*, **8**, 82–89.
79. Kakizaki, E., Yoshida, T., Kawakami, H., Oseto, M., Sakai, T., Sakai, M. (1996) Detection of bacterial antigens using immuno-PCR, *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**, 101–103.
80. He, X., McMahon, S., McKeon, T., Brandon, D.L. (2010) Development of a Novel Immuno-PCR Assay for Detection of Ricin in Ground Beef, Liquid Chicken Egg, and Milk, *J. Food. Prot.*, **73**, 695–700.

81. Mikita, K., Thakur, K., Anstey, N., Piera, K.A., Pardo, C.A., Weinberg, J.B., Mukemba, J., Florence, S., Mwaikambo, E.D., Granger, D.L. et al. (2014) Quantification of Plasmodium falciparum histidine-rich protein-2 in cerebrospinal spinal fluid from cerebral malaria patients, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **91**, 486–92.
82. Peroni, L., Reis, J., Coletta-Filho, H., de Souza, A.A., Machado, M.A., Stach-Machado, D.R. (2008) Assessment of the diagnostic potential of Immucapture-PCR and Immuno-PCR for Citrus Variegated Chlorosis, *J. Microbiol. Methods*, **75**, 302–307.
83. Barletta, J.M., Edelman, D.C., Constantine, N.T. (2004) Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen, *Am. J. Clin. Pathol.*, **122**, 20–27.
84. http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/rewfsQVGV4llc/PDF/20H9Hx8sK.pdf. Epidemiologisches Bulletin 10/2002, 77–80.
85. Kittigul, L., Ekchaloemkiet, S., Utrarachkij, F., Siripanichgon, K., Sujirarat, D., Pungchitton, S., Boonthum, A. (2004) An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples, *J. Virol. Methods.*, **124**, 117–122.
86. Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y., Matsui, Y. (2013) Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and precoagulation-microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR, *Water Res.*, **47**, 5819–5827.
87. Andreja, R., Benaissa, E., Youssef, F., Dierick, K., Zorzi, W., Heinen, E., Uner, A., Uyttendaele, M. (2012) Detection of Clostridium botulinum neurotoxins A and B in milk by ELISA and immuno-PCR at higher sensitivity than mouse bio-assay, *Food Anal. Methods*, **5**, 319–326.
88. Scarlatos, A., Welt, B.A., Cooper, B.Y., Archer, D., DeMarse, T., Chau, K.V. (2005) Methods for Detecting Botulinum Toxin with Applicability to Screening Foods Against Biological Terrorist Attacks, *J. Food Sci.*, **70**, r121–r130.
89. Sharma, S.K., Ferreira, J.L., Eblen, B.S., Whiting, R.C. (2006) Detection of Type A, B, E, and F Clostridium botulinum Neurotoxins in Foods by Using an Amplified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Digoxigenin-Labeled Antibodies, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1231–1238.
90. He, X., McMahon, S., Skinner, C., Merrill, P., Scotcher, M.C., Stancker, L.H. (2013) Development and characterization of monoclonal antibodies against Shiga toxin 2 and their application for toxin detection in milk, *J. Immunol. Methods*, **389**, 18–28.
91. He, X., McMahon, S., Henderson, T., Griffey, S.M., Cheng, L.W. (2010) Ricin Toxicokinetics and Its Sensitive Detection in Mouse Sera or Feces Using Immuno-PCR, *PLoS One.*, **5**, e12858.
92. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants <http://chm.pops.int>.
93. Chen, H., Zhuang, H. (2011) A real-time immuno-PCR method for detecting 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, *Microchim. Acta.*, **172**, 233–239.
94. Jani, D., Savino, E., Goyal, J. (2015) Feasibility of immuno-PCR technology platforms as an ultrasensitive tool for the detection of anti-drug antibodies, *Bioanalysis*, **7**, 285–94.
95. Tao, X., Jiang, H., Zhu, J., Wang, X., Wang, Z., Niu, L., Wu, X., Shi, W., Shen, J. (2014) An ultrasensitive chemiluminescent ELISA for determination of chloramphenicol in milk, milk powder, honey, eggs and chicken muscle, *Food Agric. Immunol.*, **25**, 137–148.

96. Deng, M., Xiao, X., Zhang, Y., Wu, X.H., Zhu, L.H., Xin, X.Q., Wu D.L. (2011) A highly sensitive immuno-PCR assay for detection of H5N1 avian influenza virus, *Mol. Biol. Rep.*, **38**, 1941–1948.
97. Chen, Z., Hong, L., Liu, L., Peng, D., Li, Q., Jin, B., Qiao, T., Wu, K., Fan, D. (2010) Monoclonal Antibody MG7 as a Screening Tool for Gastric Cancer, *Hybridoma*, **29**, 27–30.
98. Stegurová, L., Dráberová, E., Bartos, A., Dráber, P., Rípová, D., Dráber, P. (2014) Gold nanoparticle-based immuno-PCR for detection of tau protein in cerebrospinal fluid, *J. Immunol. Methods*, **406**, 137–142.
99. Barletta, J., Edelman, D., Highsmith, W., Constantine, N.T. (2005) Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR, *J. Virol. Methods*, **127**, 154–64.
100. Reuter, T., Gilroyed, B., Alexander, T., Mitchell, G., Balachandran, A., Czub, S., McAllister, T.A. (2009) Prion protein detection via direct immuno-quantitative real-time PCR, *J. Microbiol. Methods*, **78**, 307–311.
101. Malou, N., Tran, T.N., Nappez, C., Signoli, M., Le Forestier, C., Castex, D., Drancourt, M., Raoult, D. (2012) Immuno-PCR - A New Tool for Paleomicrobiology: The Plague Paradigm, *PLoS One.*, **7**, e31744.
102. Diel, P., Schiffer, T., Geisler, S., Hertrampf, T., Mosler, S., Schulz, S., Wintgens, K.F., Adler, M. (2010) Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive immuno-PCR, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **330**, 1–9.
103. Dong, J., Hasan, S., Fujioka, Y., Ueda, H. (2012) Detection of small molecule diagnostic markers with phage-based open-sandwich immuno-PCR, *J. Immunol. Methods.*, **377**, 1–7.
104. Kwon, K., Hwang, S., Park, Y., Yoon, J., Kim, S., Hong, J. (2014) A Quantitative Real-Time Immuno-PCR Assay for Detection of Staphylococcus Aureus Enterotoxin H, *J. Food Saf.*, **34**, 249–256.
105. Kumar, R. (2011) A Quantitative Immunopolymerase Chain Reaction Method for Detection of Vegetative Insecticidal Protein in Genetically Modified Crops, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 10448–10453.
106. Kumar, R. (2012) A real-time immuno-PCR assay for the detection of transgenic Cry1Ab protein, *Eur. Food. Res. Technol.*, **234**, 101–108.
107. Bu, D., Zhuang, H. (2014) A real-time immuno-PCR assay for the flame retardant tris(2,3-dibromopropyl) isocyanurate using a probe DNA conjugated to gold nanoparticles, *Microchim. Acta*, **182**, 1863–1868.
108. Sun, R., Zhuang, H. (2015) An ultrasensitive gold nanoparticles improved real-time immuno-PCR assay for detecting diethyl phthalate in foodstuff samples, *Anal. Biochem.*, **480**, 49–57.