

На правах рукописи



ПАНФЁРОВ ВАСИЛИЙ ГЕННАДЬЕВИЧ

**Изучение взаимодействия антител с вирусными
и бактериальными антигенами для создания
экспрессных методов определения фитопатогенов**

03.01.04 Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва-2019

Работа выполнена в лаборатории иммунобиохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Научные руководители

доктор химических наук, профессор
Дзантиев Борис Борисович,
кандидат биологических наук
Сафенкова Ирина Викторовна

Официальные оппоненты:

Мягкова Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, заведующий лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ

Осипов Александр Павлович, кандидат химических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», кафедра функциональных наносистем и высокотемпературных материалов, институт новых материалов и технологий, доцент

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе ФИЦ Биотехнологии РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Биорецепторные взаимодействия (антиген-антитело, фермент-субстрат и др.) характеризуются высокой аффинностью и специфичностью. Использование этих взаимодействий в аналитических системах позволяет определять целевые объекты в сложных смесях в низких концентрациях. Однако закономерности реализации биорецепторных взаимодействий в аналитических системах изучены не в полной мере. Существующие разработки преимущественно основываются на простых химико-кинетических представлениях с минимальным числом рассматриваемых реакций. Такие подходы недостаточны для адекватного описания систем с разделением взаимодействий в пространстве и во времени, с реализацией в кинетическом режиме ряда реакций, необходимых для формирования многокомпонентных комплексов.

Важным классом таких сложных биоаналитических систем являются иммунохроматографические тесты. Иммунохроматографический анализ (**ИХА**) основан на детектировании комплексов антител с антигеном. Отличительная особенность ИХА – использование движения компонентов пробы и иммунореагентов вдоль мембранных носителей, в результате которого на определенных участках мембран формируются меченые иммунные комплексы, детектируемые на основании оптических или других свойств метки. Широкое применение ИХА обусловлено тем, что данный анализ является экспрессным (10-15 минут), нетрудоемким, не требующим использования дополнительных приборов и устройств, пригодным для оперативного тестирования непосредственно в месте отбора пробы. Однако традиционные форматы ИХА уступают другим иммуноаналитическим методам по чувствительности и позволяют проводить определение только одного соединения. Данная ситуация определяет необходимость разработки высокочувствительных и мультиплексных (обеспечивающих определение нескольких аналитов в пробе в рамках одного анализа) форматов ИХА, сохраняющих основные преимущества метода.

Используемые сокращения и обозначения: **АСМ** – атомно-силовая микроскопия; **ВСЛК** – вирус скручивания листьев картофеля; **ДЛСР** – динамическое лазерное светорассеяние; **ЗХВК** – золотохлористоводородная кислота; **ИФА** – иммуноферментный анализ; **ИХА** – иммунохроматографический анализ; **КЗ** – контрольная зона; **мАт** – моноклональные антитела; **МЧ** – магнитные частицы; **НЧЗ** – наночастицы золота; **пАт** – поликлональные антитела; **ПЭМ** – просвечивающая электронная микроскопия; **ТЗ** – тестовая зона; **ЩФ** – щелочная фосфатаза; **Dh** – гидродинамический диаметр; **ХВК**, **СВК**, **МВК**, **АВК**, **УВК** – X, S, M, A, Y вирусы картофеля.

Цель работы – изучение взаимодействий антител с вирусными и бактериальными поливалентными антигенами для создания высокочувствительных методов определения фитопатогенов.

Достижение поставленной цели включало решение следующих **задач**:

1. Определение кинетических параметров иммунных взаимодействий.
2. Синтез и характеристика конъюгатов нанодисперсных маркеров с антителами.
3. Разработка методических подходов для снижения предела обнаружения ИХА.
4. Разработка новых форматов ИХА фитопатогенов – мультипорогового и мультиплексного.
5. Апробация разработанных методов для контроля пораженности растений вирусными и бактериальными патогенами.

Научная новизна. В рамках диссертационной работы впервые:

- описана зависимость структуры и состава комплексов вирионов Х вируса картофеля с моноклональными антителами от соотношения реагентов; выявлена аномально высокая электрофоретическая подвижность данных комплексов, обусловленная их разветвленностью;
- показана агрегативная устойчивость высококонцентрированных коллоидных растворов конъюгатов наночастиц золота с антителами, обеспечиваемая электростатическими силами отталкивания и стабилизирующим действием иммобилизованных на частицах антител;
- охарактеризованы отличия размера и формы частиц, образующихся при восстановлении золотохлористоводородной кислоты (**ЗХВК**) на затравочных наночастицах золота, которые находятся либо в коллоидном растворе, либо на мембранном носителе;
- разработаны методические подходы для снижения предела обнаружения ИХА, основанные на: а) агрегации функционализированных магнитных и золотых наночастиц; б) использовании конъюгата щелочной фосфатазы с наночастицами золота; в) увеличении размеров частиц золота при восстановлении ЗХВК в присутствии пероксида водорода;
- установлено влияние кинетических параметров иммунных взаимодействий на предел обнаружения мультипорогового ИХА; с учетом выявленных эффектов разработан ИХА с возможностью варьирования нескольких порогов для оценки концентрации целевого анализата;
- охарактеризованы состав и антигенсвязывающая активность конъюгатов наночастиц золота, полученных при одновременной иммобилизации пяти антител разной специфичности; с использованием данного

конъюгата реализован мультиплексный формат ИХА, позволяющий выявлять пять основных вирусов картофеля без их дифференцировки.

Практическая значимость работы. Разработаны иммунохроматографические тест-системы для определения вирусных и бактериальных патогенов картофеля в низких концентрациях. Предложенные подходы к снижению предела обнаружения универсальны и могут быть использованы для высокочувствительного ИХА других практически значимых аналитов. Проведенная апробация тест-систем свидетельствует об их эффективности для контроля свободного от патогенов посадочного материала, внелабораторной скрининговой характеристики большого количества проб.

Методы исследования. Представленные в работе результаты получены с использованием современных био- и иммунохимических методов. Для характеристики состава и функциональных свойств иммунореагентов применялись взаимодополняющие аналитические методы.

Степень достоверности результатов. Результаты исследования интерпретировали на основании статистически обработанных данных, что обеспечивает достоверность количественных оценок и исключает субъективность заключений. Апробация разработанных тест-систем проведена на репрезентативных выборках здоровых и зараженных растений. Отсутствие/присутствие патогенов контролировалось альтернативными аналитическими методами.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке материалов научных публикаций и написании диссертационной работы.

Положения научно-квалификационной работы, выносимые на защиту:

- Условия формирования разветвленных иммунных комплексов поливалентных вирионов с моноклональными антителами.
- Агрегативная устойчивость и функциональная активность высококонцентрированной смеси конъюгатов наночастиц золота с антителами в гомогенных условиях.
- Влияние частичного блокирования поверхности наночастиц золота на восстановление солей золота и морфологию формирующихся частиц в коллоидном растворе и на мембране.
- Методические подходы для снижения пределов обнаружения иммунохроматографического анализа.
- Контролируемое изменение количества иммунных комплексов в проточной мультипороговой системе, основанное на варьировании кинетических параметров иммунных взаимодействий.

- Мультипороговый и мультиплексные форматы иммунохроматографического анализа вирусных и бактериальных фитопатогенов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8-11 февраля 2016 г., Москва), Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (15-17 марта 2016 г., Москва), 18th International Symposium on Flow and Field Based Separations (22-26 мая 2016 г., Дрезден, Германия), Международная конференция «Point-of-care diagnostics» (10-11 мая 2017 г., Мюнхен, Германия), 11th International Conference «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (25-30 июня 2017 г., Московская область), Третий съезд аналитиков России (8-13 октября 2017 г., Московская область), 9th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» (6-13 мая 2018 г., Ираклион, Греция), Научно-практическая конференция «Нормативное регулирование и современные методы диагностики патогенов в семеноводстве картофеля» (10-11 июля 2018 г., Московская область), VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (18-21 сентября 2018 г., Ялта), Международная научно-практическая конференция «Современные технологии и средства защиты растений – платформа для инновационного освоения в АПК России» (8-12 октября 2018 г., Санкт-Петербург), 12th Conference «Rapid Methods Europe» (5-7 ноября 2018 г., Амстердам, Нидерланды).

Исследования, выполнявшиеся в рамках диссертационной работы, были отмечены стипендией Президента РФ и стипендией имени чл.-корр. РАН В.Л. Кретовича (2018 г).

Публикации по материалам диссертационной работы включают 11 статей в международных журналах и 13 тезисов конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение), заключения и списка литературы (231 источник). Работа изложена на 156 страницах, включает 77 рисунков и 16 таблиц.

В первой главе диссертации представлен литературный обзор – общие закономерности ИХА, факторы, определяющие предел обнаружения ИХА, структура и свойства вирусных и бактериальных фитопатогенов. Во второй главе приведены сведения о реагентах и методиках, использованных в работе. В третьей главе описаны и обсуждены полученные результаты – установленные кинетические параметры иммунных взаимодействий, характеристики иммунореагентов, модифицированных нанодисперсными

маркерами, предложенные и реализованные методические подходы для снижения пределов обнаружения ИХА, апробация разработанных тест-систем.

Основные результаты и их обсуждение

Характеристика фитопатогенов и иммунореагентов

В качестве объектов исследования выбраны приоритетные патогены картофеля вирусной и бактериальной природы – вирус скручивания листьев картофеля (**ВСЛК**), X, S, M, A, Y вирусы картофеля (**ХВК**, **SBK**, **MBK**, **ABK**, **YBK**), *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*. Методами атомно-силовой (**АСМ**) и просвечивающей электронной микроскопии (**ПЭМ**) охарактеризована морфология патогенов, подтверждена их корпускулярная структура и чистота препаратов (примеры полученных результатов приведены на рис. 1).

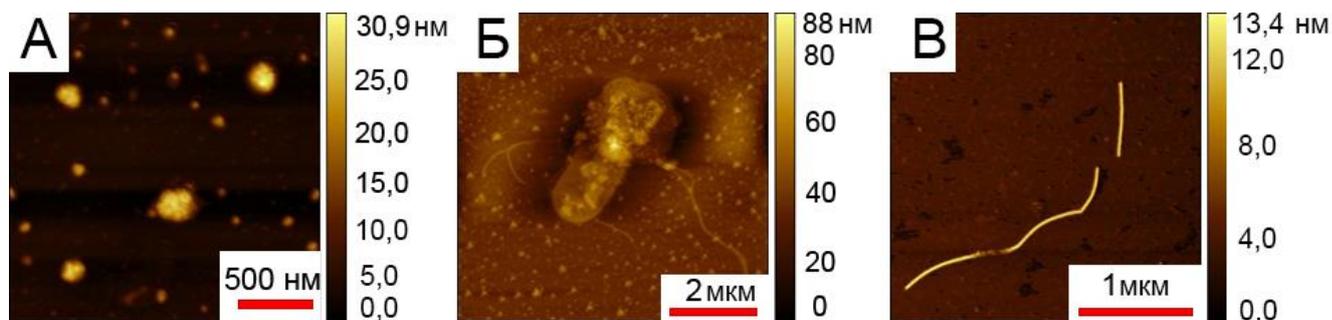


Рис.1. Изображения фитопатогенов, полученные методом АСМ. А – ВСЛК, Б – *D. solani*, В – SBK

В работе использованы полученные в рамках исследования и предоставленные ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха специфические антисыворотки к очищенным препаратам фитопатогенов. Методом иммуноферментного анализа (**ИФА**) показан высокий титр (более 10^6) специфических антител в антисыворотках и их низкая перекрестная реактивность (не более 0,2%) по отношению к близким по систематическому положению патогенам. Антисыворотки были использованы для выделения IgG фракции поликлональных антител (**пАт**).

Кинетические параметры иммунных взаимодействий определяли в биосенсорной системе, регистрируя поверхностный плазмонный резонанс образующихся комплексов. В экспериментах использовали ХВК и различные иммунореагенты – моноклональные антитела (**мАт**), пАт и Fab-фрагменты (табл. 1).

Табл. 1. Кинетические и равновесные константы ассоциации и диссоциации ХВК с иммунореагентами

Иммунореагент	k_a , 1/(M c)	k_d , 1/c	K_a , 1/M	K_d , M
мАт клона 3G4	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(9,8 \pm 1,5) \times 10^{-4}$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^8$	$(4,3 \pm 0,8) \times 10^{-9}$
Fab-фрагменты мАт 3G4	$(2,4 \pm 0,5) \times 10^5$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(7,1 \pm 1,6) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^{-8}$
мАт клона 1A5	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^4$	$(3,4 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^8$	$(8,7 \pm 1,1) \times 10^{-9}$
пАт	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^4$	$(3,2 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^8$	$(8,6 \pm 1,5) \times 10^{-9}$

Для разработки тест-систем были выбраны высокоаффинные моноклональные антитела клона 3G4. Менее аффинные антитела были использованы для ИХА с регулируемым пределом обнаружения.

Структурная характеристика иммунных комплексов

Методом АСМ охарактеризована структура иммунных комплексов. Для пары ХВК – мАт клона 3G4 показано, что агрегация вирионов при взаимодействии с бивалентными антителами приводит к формированию разветвленных комплексов (рис. 2). Взаимодействия вирионов с Fab-фрагментами и неспецифическими антителами не вызывают агрегации. Размер, форма и состав иммунных комплексов, количество вирионов в агрегатах определяются соотношением реагентов.

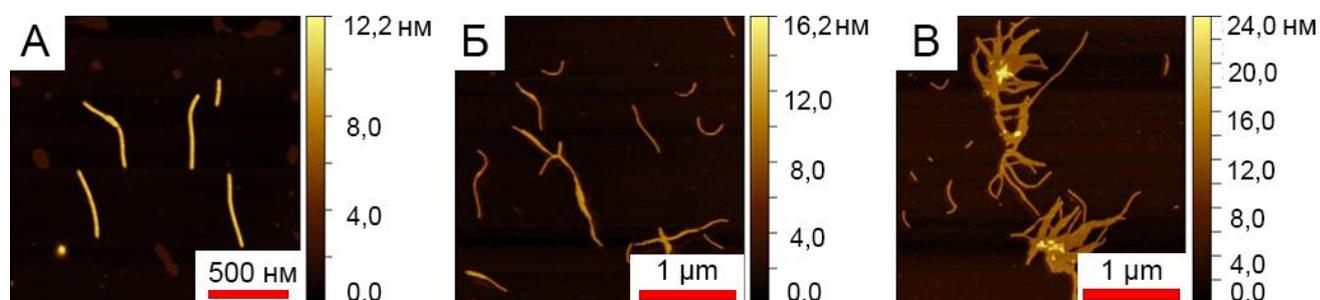


Рис. 2. АСМ изображения ХВК (А) и его комплексов с мАт клона 3G4 при мольных соотношениях 1:200 (Б) и 1:500 (В)

Для характеристики состава разветвленных агрегатов был использован гомогенный метод фракционирования – капиллярный электрофорез (рис. 3) (эксперименты выполнялись совместно с группой С.Н. Крылова, Университет Йорка, Канада). Комплексы ХВК – мАт вследствие разветвленной структуры характеризуются нелинейным увеличением соотношения заряда к коэффициенту трения по сравнению с исходными вирионами и антителами.

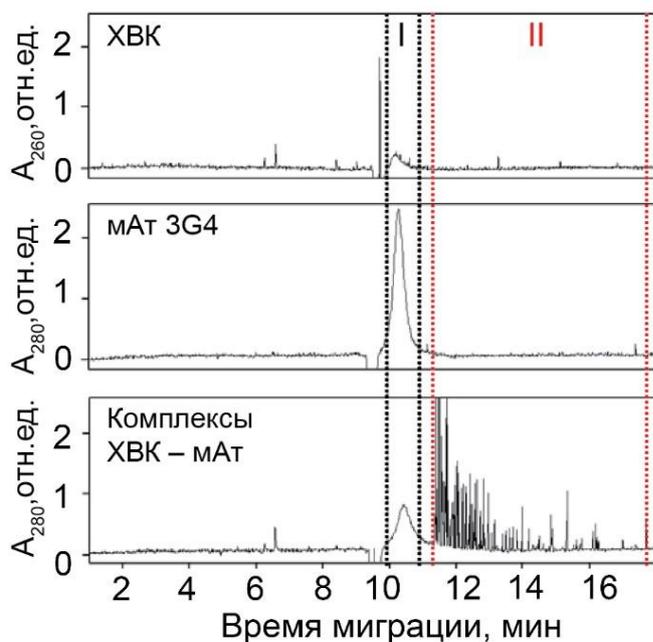


Рис. 3. Электрофореграммы вирионов, иммунореагентов и комплексов. Пунктиром обозначены границы времени миграции свободных вирусных частиц и антител (I) и иммунных комплексов (II)

При взаимодействии антител с поливалентными вирусными частицами происходит формирование агрегатов различного состава (см. рис. 3, комплексы ХВК – mAb).

Синтез и характеристика конъюгатов антител с маркерами

Были синтезированы конъюгаты наночастиц золота (**НЧЗ**) и магнитных частиц (**МЧ**) с антителами против вирусных и бактериальных патогенов картофеля, стрептавидином, конъюгатом щелочной фосфатазы (**ЩФ**) с антивидовыми антителами. Для синтезов использовали методы физической адсорбции, ковалентной иммобилизации, а также иммобилизации с помощью высокоаффинных межмолекулярных модулей (биотин – стрептавидин, антитело – антивидовое антитело). Методами ПЭМ и динамического лазерного светорассеяния (**ДЛСР**) показано отсутствие агрегатов в конъюгатах.

Методом асимметричного фракционирования в поле поперечных сил показана агрегативная устойчивость высококонцентрированных (до $A_{520}=80$) индивидуальных и смешанных коллоидных растворов конъюгатов НЧЗ с антителами (рис. 4). Значения гидродинамического диаметра частиц (D_h) находятся в пределах 25-60 нм, что подтверждает отсутствие агрегатов. Электростатические силы отталкивания и наличие адсорбированных белков стабилизируют препараты конъюгатов НЧЗ и препятствуют агрегации частиц даже в условиях, близких к молекулярному краудингу (≈ 1 мг/мл антител, более 10^{13} НЧЗ в мл).

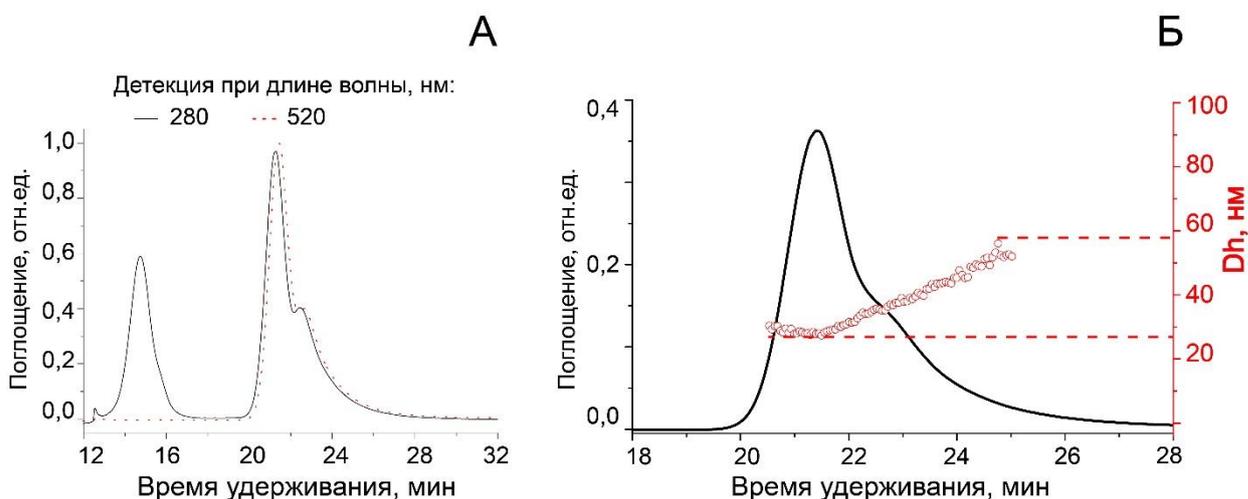


Рис. 4. Фрактограммы разделения в поле поперечных сил смеси восьми конъюгатов НЧЗ с антителами ($A_{520} = 80$). А – детекция белка (280 нм) и НЧЗ (520 нм); Б – D_h частиц смеси конъюгата, детекция при 280 нм

Синтезированные конъюгаты функционально активны в течение длительного периода (более года). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования высококонцентрированных препаратов конъюгатов НЧЗ с антителами в иммунохроматографических тест-системах.

Разработка ИХА фитопатогенов вирусной и бактериальной природы

Вследствие иммунохимической поливалентности фитопатогенов реализуемый для них ИХА основан на формировании и детекции на тест-полоске «сэндвич» комплексов антитело – антиген – меченое антитело (рис. 5, 1). Разработаны тест-системы для определения приоритетных патогенов картофеля вирусной и бактериальной природы. Пределы обнаружения ИХА составили 3–12 нг/мл для вирусов и 2×10^3 – 10^5 клеток/мл для бактерий. Однако данные уровни недостаточны для выявления скрытых инфекций на начальных этапах заражения растений, что обуславливает необходимость дальнейшего снижения пределов обнаружения.

Предложены и реализованы три методических подхода для снижения предела обнаружения ИХА, основанные на:

- агрегации функционализированных МЧ и НЧЗ (рис. 5, 2);
- использовании конъюгатов щелочной фосфатазы с НЧЗ и регистрации активности фермента (рис. 5, 3);
- увеличении размера маркера посредством восстановления солей серебра и золота на поверхности НЧЗ (рис. 5, 4).

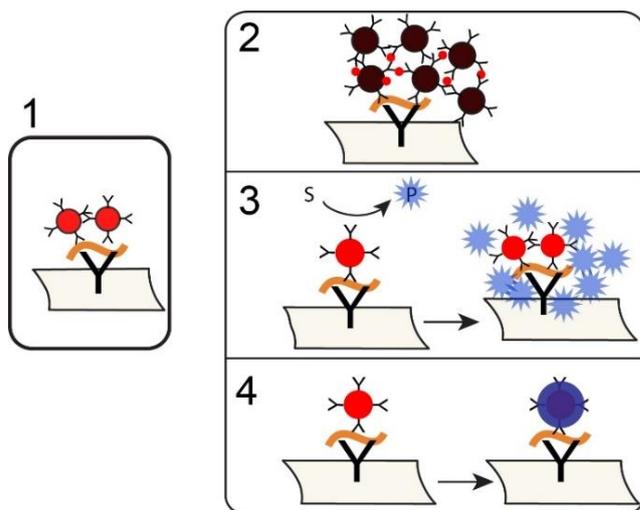


Рис. 5. Иммуные комплексы в тестовой зоне;
1 – в классическом «сэндвич»-ИХА;
2-4 – в вариантах ИХА с усилением

ИХА с агрегацией функционализированных магнитных частиц и НЧЗ

Синтезированы два вида конъюгатов – МЧ с биотинилированными антителами против ХВК и НЧЗ со стрептавидином. Снижение предела обнаружения обеспечивается магнитным концентрированием ХВК из пробы и формированием агрегатов МЧ – НЧЗ (рис. 6) вследствие высокоаффинного взаимодействия биотин – стрептавидин. Единичные НЧЗ из-за небольшого размера ($\varnothing \approx 20$ нм) могут связывать не более двух МЧ ($\varnothing \approx 400$ нм). Методом ПЭМ показано, что, помимо агрегации МЧ, происходит декорирование их поверхности наночастицами золота. Варьирование соотношения концентраций НЧЗ и МЧ позволяет формировать агрегационные комплексы разного состава (рис. 6, Б, В).

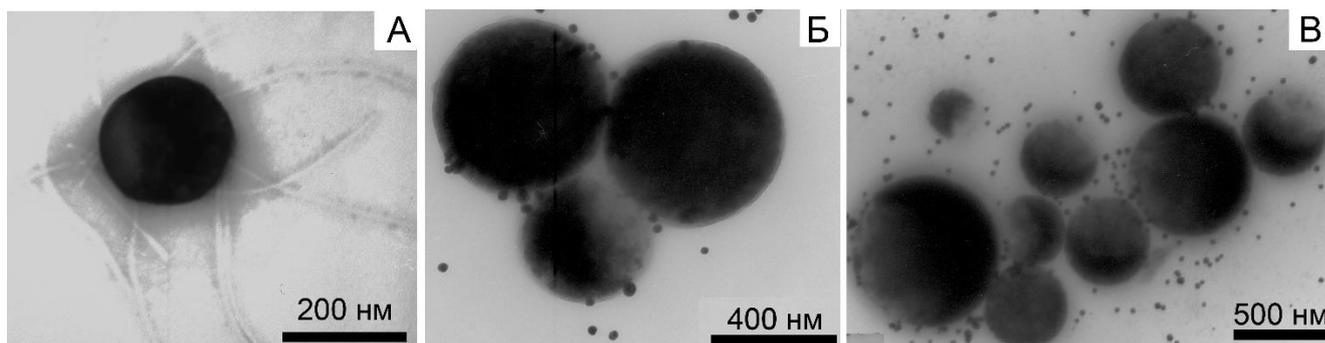


Рис. 6. Микрофотографии гетероагрегатов разного состава: А – комплекс ХВК – МЧ, Б, В – комплексы МЧ – НЧЗ

В результате аккумуляции в тестовой зоне агрегатов МЧ – НЧЗ предел обнаружения ХВК снижается в 32 раза – до 0,25 нг/мл (рис. 7). Продолжительность анализа – 25 минут. Магнитное концентрирование ХВК из экстрактов позволяет нивелировать влияние матрикса на характеристики ИХА.

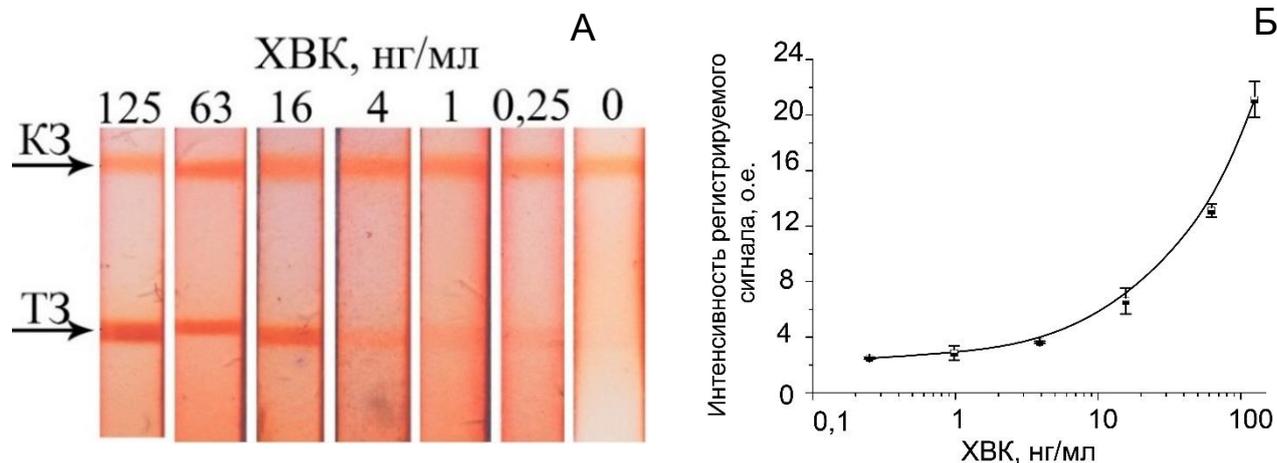


Рис. 7. Агрегация МЧ и НЧЗ для снижения предела обнаружения ИХА. А – тест-полоски после ИХА различных концентраций ХВК в экстракте листьев картофеля. Б – зависимость интенсивности регистрируемого сигнала от концентрации ХВК

Использование в ИХА конъюгата щелочной фосфатазы с НЧЗ

Предлагаемое снижение предела обнаружения основано на регистрации ферментативной активности ЩФ, включаемой в состав иммунных комплексов. В анализе используются два взаимодействующих конъюгата НЧЗ. Конъюгат НЧЗ с мАт связывает ХВК в пробе и формирует в тестовой зоне тройные иммунные комплексы (иммобилизованные антитела – ХВК – конъюгат НЧЗ – мАт). Конъюгат антивидовые антитела – ЩФ – НЧЗ, взаимодействуя с мАт, также связывается в тестовой зоне. При добавлении субстратного раствора (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат + тетразолий нитросиний) ЩФ катализирует реакцию, приводящую к накоплению нерастворимого окрашенного продукта в тестовой зоне. Установлено, что при пятиминутной инкубации интенсивность регистрируемого сигнала достигает уровня, достоверно не отличающегося от насыщающего (рис. 8). Конъюгат антивидовые антитела – ЩФ – НЧЗ стабилен в течение длительного времени; даже 90-дневное хранение при 45°C вызывает лишь 15%-ное снижение ферментативной активности.

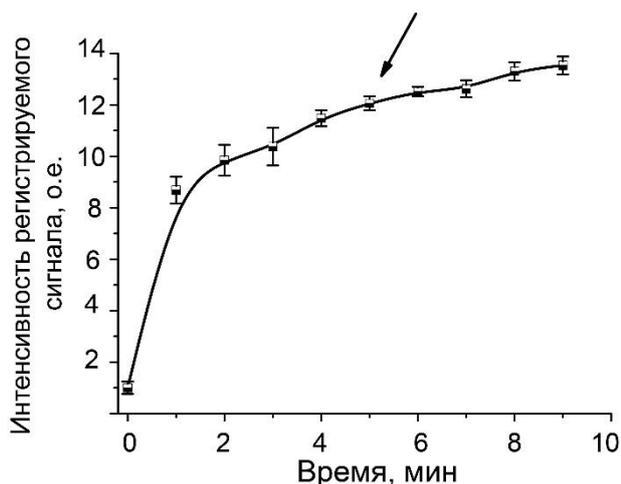


Рис. 8. Зависимость интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне от времени инкубации ЩФ с субстратом на мембране. Выбранное время (5 мин) отмечено стрелкой

Изображения тест-полосок до и после усиления сигнала с использованием ЩФ представлены на рис. 9, А. Накопление окрашенных продуктов ферментативной реакции изменяет цвет тестовой зоны и повышает ее контрастность. Показано, что компоненты тестируемых растительных матриц не ингибируют ЩФ.

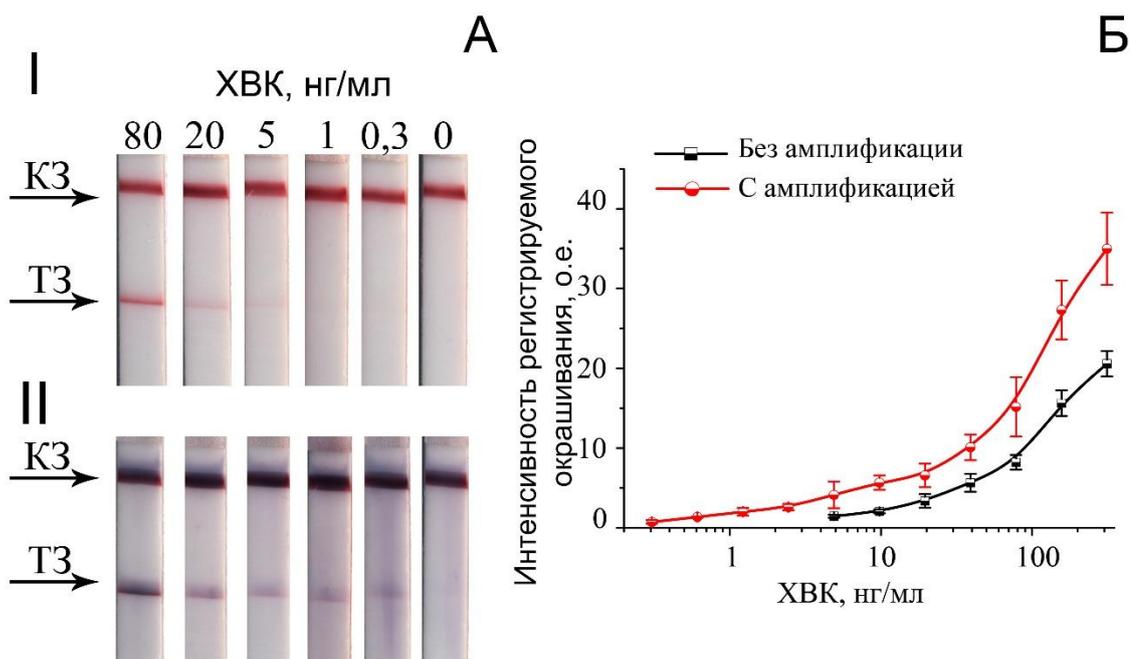


Рис. 9. Использование конъюгата ЩФ с НЧЗ для снижения предела обнаружения ИХА. А – внешний вид тест-полосок без амплификации (I) и с ферментативной амплификацией (II) при различных концентрациях ХВК в пробе. Б – зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ХВК в экстракте листьев картофеля

Увеличение интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне снижает предел обнаружения ХВК в 27 раз – до 0,3 нг/мл (рис. 9, Б). Продолжительность анализа – 15 минут.

ИХА с увеличением размера маркера при восстановлении солей серебра и золота наночастицами золота

Подход основан на формировании крупных частиц при восстановлении солей серебра (серебряное усиление) или золота (золотое усиление) на поверхности НЧЗ, находящихся в тестовой зоне.

В ходе экспериментальной характеристики подхода определены оптимальные режимы проведения анализа, в том числе восстановления солей металлов, обеспечивающие максимальное увеличение регистрируемого сигнала и минимальный фон. Восстановление лактата серебра приводит к формированию частиц с НЧЗ в качестве ядра и оболочкой из серебра, сопровождающееся изменением окрашивания тестовой зоны с красного (из-за аккумуляции НЧЗ с $\varnothing \approx 20$ нм) на черный (из-за восстановления серебра на поверхности НЧЗ) (рис. 10, А). Серебряное усиление снижает предел обнаружения ИХА ВСЛК в 15 раз, до 0,2 нг/мл (рис. 10, Б) и в 10 раз для *Ralstonia solanacearum* (до 200 клеток/мл).

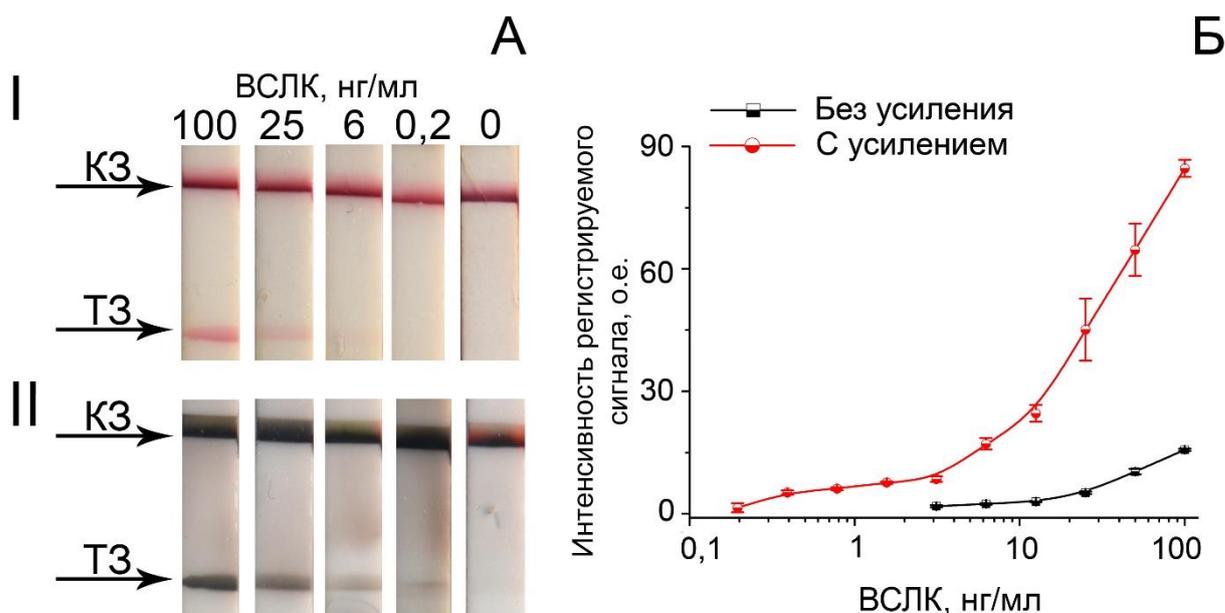


Рис. 10. Серебряное усиление для снижения предела обнаружения ИХА. А – тест-полоски после анализа концентраций ВСЛК в экстракте листьев картофеля до (I) и после (II) серебряного усиления. Б – зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов тестовых зон от концентрации ВСЛК до и после серебряного усиления

Восстановление на поверхности затравочных НЧЗ ($\varnothing \approx 20-25$ нм) ЗХВК в присутствии пероксида водорода (усиливающий раствор состоит из равных объемов 2,5 мМ ЗХВК и 1,86 М пероксида водорода) вызывает увели-

чение интенсивности окрашивания коллоидного раствора вследствие увеличения размера частиц. Методом сканирующей электронной микроскопии показано, что золотое усиление на поверхности мембран приводит к формированию крупных частиц (до 370 нм) (рис. 11). С помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии подтверждено, что основной компонент частиц – золото.

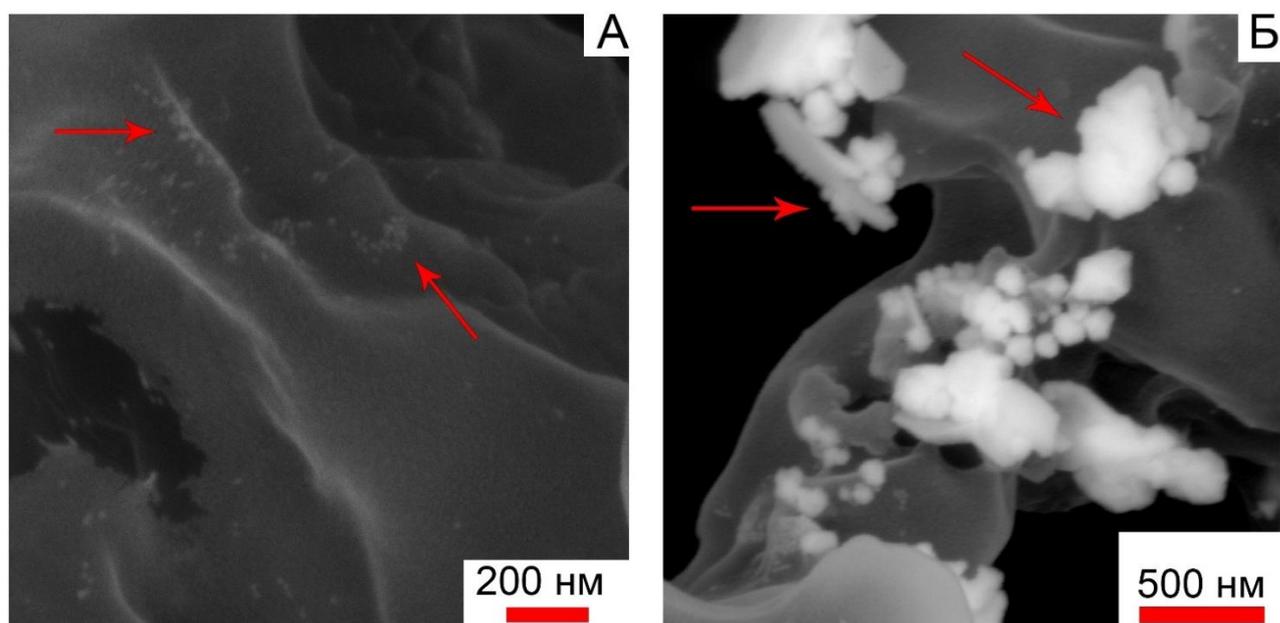


Рис. 11. НЧЗ в тестовой зоне иммунохроматографической тест-полоски до (А) и после (Б) после золотого усиления. Красными стрелками отмечены частицы золота. Микрофотографии получены методом сканирующей электронной микроскопии

Формирование крупных несферических частиц в тестовой зоне приводит к изменению цвета и интенсивности ее окрашивания (рис. 12). Основное увеличение регистрируемого сигнала (до 90%) в тестовой зоне происходит в первые 60 сек после добавления усиливающего раствора. Компоненты матрикса не влияют на процессы золотого усиления. Установлено, что частицы, получаемые при росте НЧЗ в коллоидном растворе и на мембране, существенно отличаются. Восстановление ЗХВК в коллоидном растворе приводит к формированию сферических гомогенных частиц в среднем вдвое большего диаметра. При росте НЧЗ, адсорбированных на подложке (медной сетке для ПЭМ) или находящихся в порах нитроцеллюлозной мембраны, компоненты усиливающего раствора поступают к поверхности частиц неравномерно, и образуются существенно бóльшие (до 370 нм) несферические частицы (рис. 13).

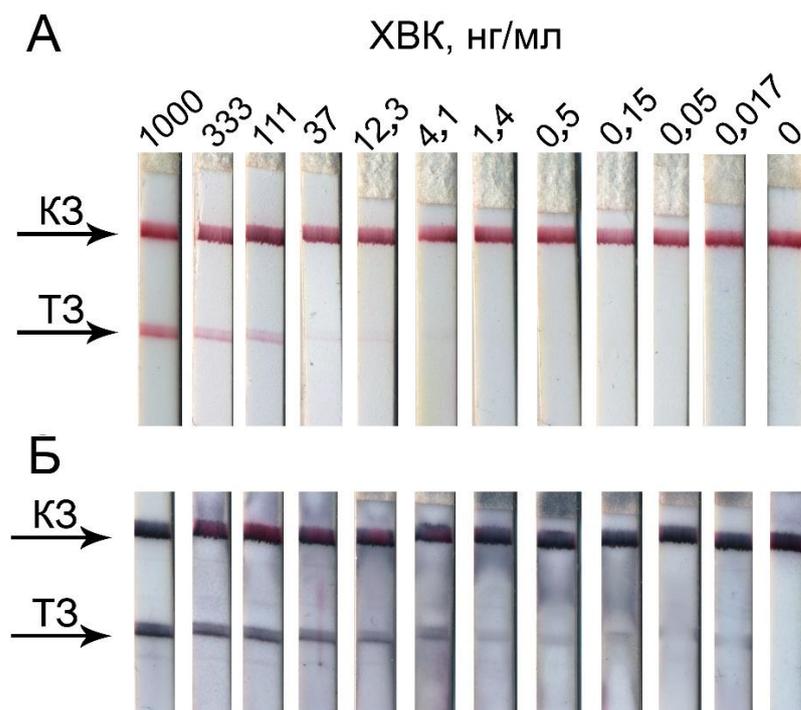


Рис. 12. Тест-полоски после ИХА различных концентраций ХВК в экстракте листьев картофеля до (А) и после (Б) после золотого усиления

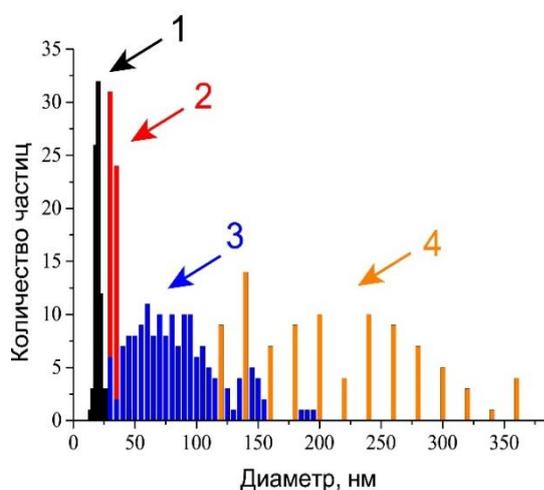


Рис. 13. Гистограммы распределения по диаметру. 1 – исходные НЧЗ. Частицы после золотого усиления: 2 – в коллоидном растворе, 3 – на подложке (медной сетке для ПЭМ), 4 – на мембране

Крупные несферические НЧЗ имеют больший коэффициент молярной экстинкции по сравнению с исходными НЧЗ, что приводит к росту интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне. Золотое усиление снижает предел обнаружения ХВК в 240 раз, до 17 пг/мл (рис. 14).

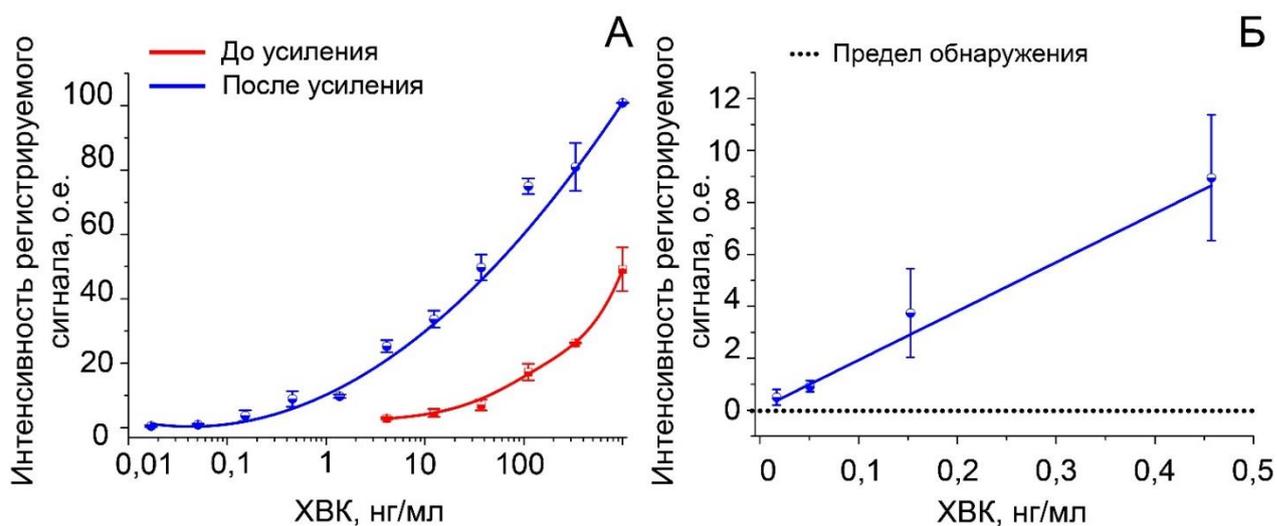


Рис. 14. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ХВК до и после золотого усиления. Б – детализация при низких концентрациях ХВК

В табл. 2 суммированы характеристики предложенных в работе методических подходов. Как видим, они занимают мало времени (до 1 минуты) и позволяют значительно (до 240 раз) снизить предел обнаружения ИХА.

Табл. 2. Сравнение предложенных подходов для снижения предела обнаружения ИХА

Характеристика	Подходы, основанные на:			
	агрегации МЧ-НЧЗ	регистрации активности ЩФ	серебряном усилении	золотом усилении
Снижение предела обнаружения	32 раза для ХВК	27 раз для ХВК	10 раз для <i>R. solanacearum</i> , 15 раз для ВСЛК	240 раз для ХВК
Используемые реагенты и оборудование	Магнит	Раствор субстрата	Навески соли серебра и гидрохинона	Растворы ЗХВК и пероксида водорода
Длительность амплификации сигнала	30 минут	5 минут	5 минут	1 минута

Мультипороговый ИХА

На полоску наносили три тестовые зоны, содержащие антитела с разной аффинностью (см. табл. 1) и концентрацией. Для мечения иммунных комплексов использовали конъюгат МЧ с мАт клона 3G4 против ХВК.

При миграции вдоль тест-полоски проба последовательно проходит через несколько тестовых зон ($TЗ_1$, $TЗ_2$, $TЗ_3$) с иммобилизованными антителами, что приводит к формированию тройных иммунных комплексов. Установлено, что для мультипорогового ИХА предел обнаружения тестовой зоны определяется не только кинетическими константами ассоциации/диссоциации антител (k_{ai} и k_{dj}) и их концентрацией ($A_{общ}$), но и количеством иммунных комплексов в каждой из предыдущих (N) тестовых зон (а значит, и k_{ai-N} , k_{dj-N} , $A_{общN}$). Выбор антител, изменение их положения и концентрации на тест-полоске позволяют варьировать предел обнаружения ХВК почти на три порядка – от 3 до 2000 нг/мл (табл. 3). Окрашивание каждой тестовой зоны отражает достижение определенной концентрации вируса в пробе и позволяет оценивать степень инфицированности растения.

Табл. 3. Концентрации, антитела и пределы обнаружения для различных вариантов ИХА ХВК в мультипороговом формате

№	Антитела и их концентрация (нг/мл) в тестовой зоне			Предел обнаружения, нг/мл		
	$TЗ_1$	$TЗ_2$	$TЗ_3$	$TЗ_1$	$TЗ_2$	$TЗ_3$
1	пАт; 1,0	1А5; 0,3	1А5; 0,1	3	600	2000
2	пАт; 1,0	3G4; 0,5	3G4; 0,2	3	30	150
3	пАт; 1,0	3G4; 0,8	3G4; 0,4	3	30	80
4	пАт; 0,8	3G4; 0,5	3G4; 0,2	10	25	60
5	3G4; 1,0	3G4; 0,5	3G4; 0,2	8	20	60
6	пАт; 0,5	3G4; 0,5	3G4; 0,5	15	35	80
7	пАт; 1,0	1А5; 0,5	1А5; 0,2	3	200	550
8	пАт; 1,0	1А5; 1,0	1А5; 0,5	3	150	300

Для снижения предела обнаружения тестовой зоны может быть использована иммобилизация антител с большей аффинностью либо в большей концентрации. Например, при замене в $TЗ_2$ антител клона 3G4 (№2) на менее аффинные антитела клона 1А5 (№7) в той же концентрации предел обнаружения увеличивается с 30 до 200 нг/мл. При снижении концентрации антител клона 1А5 в $TЗ_2$ в два раза (№7 и №8) предел обнаружения возрастает со 150 до 200 нг/мл. Двукратное повышение концентрации антител клона 3G4 в $TЗ_3$ (№2 и №3) приводит к снижению предела обнаружения со 150 до 80 нг/мл.

В рекомендуемом варианте №2 пределы обнаружения тестовых зон ИХА позволяют дифференцировать растения с разной степенью выраженности вирусной инфекции (рис. 15).

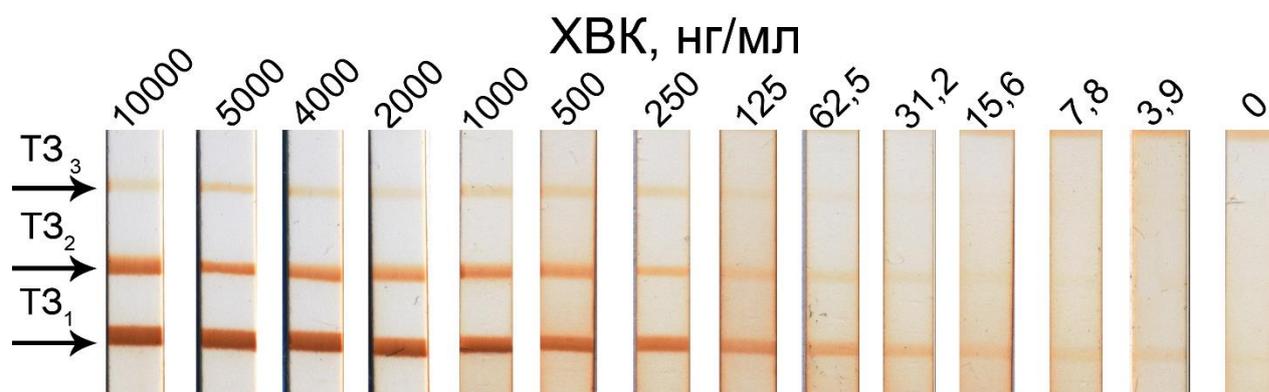


Рис.15. Внешний вид мультипороговых тест-полосок (вариант №2) после ИХА препаратов с разными концентрациями ХВК

Магнитное концентрирование снижает пределы обнаружения до 0,5, 8 и 30 нг/мл для ТЗ₁-ТЗ₃, соответственно. Отметим, что с помощью магнитного концентрирования, варьируя объемы исходных и конечных проб, можно также дополнительно сдвигать пороговые уровни в ИХА.

Мультиплексный ИХА

Предложено два формата мультиплексного ИХА. Первый формат основан на использовании одного конъюгата НЧЗ с адсорбированными антителами разной специфичности (мультиспецифичный конъюгат) и тест-полоски, содержащей в тестовой зоне смесь антител (рис. 16, А). Данный формат позволяет одновременно выявлять до пяти вирусных патогенов картофеля без их дифференцировки и может быть использован в качестве средства первичного скрининга.

Оптимизированы условия синтеза конъюгатов НЧЗ со смесью пяти антител разной специфичности. Определена функциональная активность конъюгатов и ее зависимость от количества иммобилизуемых антител. Проведена оценка количества антител каждой специфичности, адсорбированных на единичной НЧЗ, а также количества функционально активных антител. Полученные зависимости интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне от концентраций пяти вирусов в экстракте листьев картофеля представлены на рис. 16, Б.

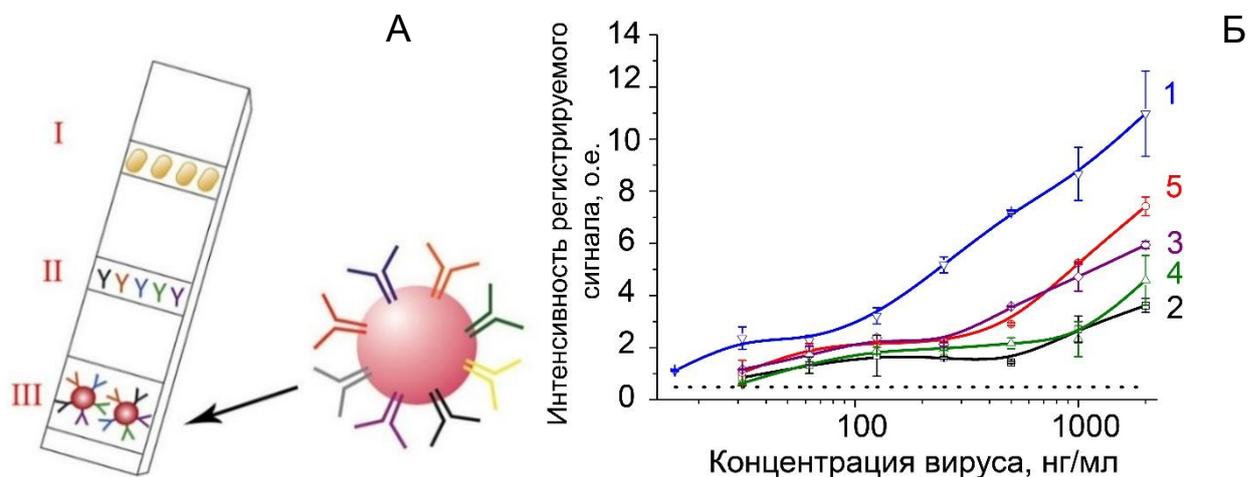


Рис. 16. Мультиплексный ИХА для определения пяти вирусов. А – структура тест-полоски с белком А в контрольной зоне (I), смесью антител в тестовой зоне (II) и мультиспецифичным конъюгатом (III). Б – зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов от концентраций вирусов: 1 – ХВК, 2 – ВСЛК, 3 – УВК, 4 – СВК, 5 – МВК

Предел обнаружения ИХА с мультиспецифичным конъюгатом составляет 10 нг/мл для ХВК и 30 нг/мл для МВК, СВК, УВК и ВСЛК. Несмотря на рост предела обнаружения по сравнению с монотестами, ИХА с мультиспецифичным конъюгатом позволяет увеличить производительность внелабораторного тестирования.

Второй предложенный формат мультиплексного ИХА основан на формировании на мембране матрицы точечных тестовых зон и использовании смеси конъюгатов НЧЗ с антителами разной специфичности. Установлены оптимальные режимы нанесения иммунореагентов на тест-полоску. Данный формат позволяет одновременно выявлять до десяти фитопатогенов. Предел обнаружения составляет 32 нг/мл для X, Y^N (некротического штамма), M, S вирусов картофеля и ВСЛК и 64 нг/мл для Y^O (обыкновенного штамма), вируса картофеля. Предел обнаружения бактерий – 10³ кл./мл для *S. michiganensis*, 10⁴ кл./мл для *P. atrosepticum* и 10⁶ кл./мл для *P. carotovorum* и *Dickeya solani*.

Предел обнаружения ограничивается уменьшившимся содержанием конъюгатов каждой специфичности в общей смеси, которое не может быть увеличено из-за появления неспецифического окрашивания. Поэтому для снижения предела обнаружения использовали серебряное усиление (рис. 17). Пределы обнаружения мультиплексного ИХА с усилением составили для ХВК и ВСЛК 2 нг/мл, МВК, СВК, Y^NВК – 4 нг/мл, Y^OВК – 8 нг/мл, *Clavibacter michiganensis* – 10³ клеток/мл, *P. atrosepticum* – 10⁴ клеток/мл, *P.*

carotovorum и *D. solani* – 10^5 клеток/мл. Продолжительность анализа – 15 минут.

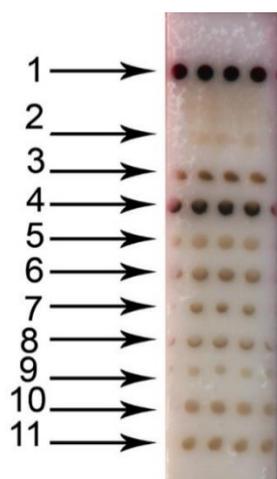


Рис. 17. Мультиплексный ИХА тест-полоска с точечным нанесением тестовых зон после усиления серебром. 1 – контрольная зона, 2–11 – антитела в тестовых зонах против: 2 – *P. atrosepticum*; 3 – *P. carotovorum*; 4 – *C. michiganensis*; 5 – *D. solani*; 6 – ХВК; 7 – МВК; 8 – SBK; 9 – Y°ВК; 10 – Y^NВК; 11 – ВСЛК. Концентрации вирусов – 250 нг/мл, бактерий – 10^7 клеток/мл

Апробация тест-систем

Разработанные моно - и мультиплексные тест-системы были апробированы на репрезентативной панели проб (более 300 зараженных и здоровых растений). Апробация проведена совместно с ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха и Всероссийским центром карантина растений. ИХА с мультиспецифичным конъюгатом показал 100%-ную корреляцию качественных результатов с ИФА. Мультиплексный точечный ИХА определяет фитопатогены во всех зараженных растениях. Ложноположительных результатов анализа не наблюдалось.

Предложенные методические подходы для снижения предела обнаружения позволяют определять фитопатогены в пробах, для которых ИХА без усиления дает отрицательный результат (рис. 18).

Показана высокая специфичность тест-систем. Так, при контроле бактериальных фитопатогенов продемонстрировано отсутствие ложноположительных результатов для близкородственных бактерий (18 штаммов). Количественные результаты ИХА показывают высокую корреляцию с ИФА (например, для *R. solanacearum* $R^2=0,96$).

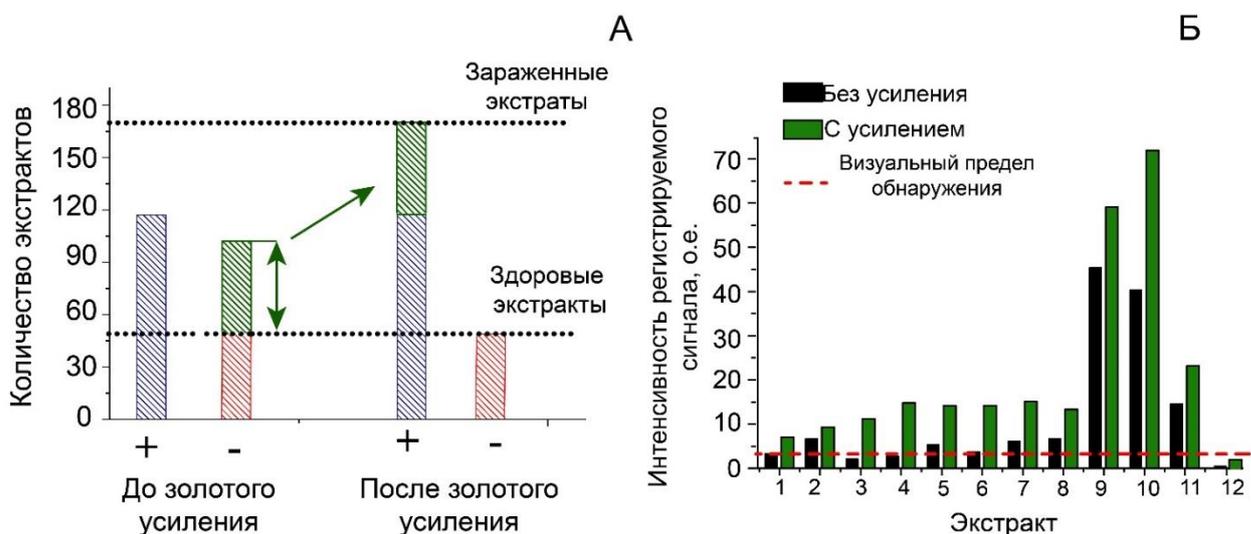


Рис. 18. Сравнение результатов ИХА с усилением и без усиления при контроле фитопатогенов в листьях картофеля. А – рост достоверности качественной диагностики ХВК при использовании золотого усиления. Б – увеличение интенсивностей регистрируемых сигналов при использовании конъюгата ЩФ для определения ХВК

ВЫВОДЫ

1. Установлены концентрационные диапазоны моноклональных антител и вирионов X вируса картофеля, обеспечивающие формирование разветвленных агрегатов различного состава. Микрогетерогенность агрегатов подтверждена методом капиллярного электрофореза.
2. Охарактеризована агрегативная устойчивость коллоидных растворов конъюгатов сферических наночастиц золота с поликлональными антителами (гидродинамический диаметр частиц конъюгатов находится в пределах 25-60 нм). Показано, что электростатические силы отталкивания и стабилизация адсорбированными молекулами белка предотвращают агрегацию частиц даже в высококонцентрированных препаратах ($A_{520}=80$).
3. Показаны отличия в восстановлении золотохлористоводородной кислоты в присутствии пероксида водорода наночастицами золота в коллоидном растворе и на мембране, обусловленные частичным блокированием поверхности наночастиц. Установлено, что увеличение адсорбированных на мембране частиц приводит к формированию несферических крупнодисперсных агрегатов с размером до 370 нм.
4. Предложены и охарактеризованы три подхода для снижения пределов обнаружения иммунохроматографического анализа, основанные на агрегации наночастиц золота и магнитных частиц, усилении регистрируемого

оптического сигнала наночастиц золота при восстановлении на их поверхности солей серебра и золота, использовании конъюгата наночастиц золота с щелочной фосфатазой. Разработанные подходы позволяют снизить пределы обнаружения патогенов картофеля до 240 раз по сравнению с существующими методами.

5. Показано, что изменение концентрации и положения иммобилизованных антител с различной аффинностью в мультипороговом формате иммунохроматографического анализа позволяет варьировать предел обнаружения X вируса картофеля в диапазоне от 3 до 2000 нг/мл.

6. Охарактеризован состав и антигенсвязывающая активность конъюгатов наночастиц золота при одновременной адсорбции пяти антител с различной специфичностью. Реализован мультиплексный формат иммунохроматографического анализа, позволяющий с использованием данных конъюгатов выявлять пять основных вирусов картофеля без их дифференцировки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Drenova N.V., Kornev K.P., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of the sensitive lateral flow immunoassay with silver enhancement for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers. *Talanta*, 2016, v. 152, pp. 521–530.
2. Beloborodov S.S., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Krylova S.M., Dzantiev B.B., Krylov S.N. Unexpected electrophoretic behavior of complexes between rod-like virions and bivalent antibodies. *Analytical Chemistry*, 2016, v. 88, N 26, pp. 11908–11912.
3. Safenkova I.V., Slutsкая E.S., **Panferov V.G.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Complex analysis of concentrated antibody-gold nanoparticle conjugates' mixtures using asymmetric flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A*, 2016, v. 1477, pp. 56–63.
4. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles. *Talanta*, 2017, v. 164, pp. 69–76.
5. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhancement of lateral flow immunoassay by alkaline phosphatase: a simple and highly sensitive test for potato virus X. *Microchimica Acta*, 2018, v. 185, art. 25.
6. Razo S.C., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X

based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 2018, v. 1007, pp. 50–60.

7. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Byzova N.A., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Silver-enhanced lateral flow immunoassay for highly-sensitive detection of potato leafroll virus. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, v. 29, N 1, pp. 445–457.

8. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Post-assay growth of gold nanoparticles as a tool for highly sensitive lateral flow immunoassay. Application to the detection of potato virus X. *Microchimica Acta*, 2018, v. 185, art. 506.

9. Razo S.C., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. How to improve sensitivity of sandwich lateral flow immunoassay for corpuscular antigens on the example of potato virus Y? *Sensors*, 2018, v. 18, art. 3975.

10. Razo S.C., Panferova N.A., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Drenova N.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. Enlargement of gold nanoparticles for sensitive immunochromatographic diagnostics of potato brown rot. *Sensors*, 2019, v. 19, art. 153.

11. Safenkova I.V., **Panferov V.G.**, Panferova N.A., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Alarm lateral flow immunoassay for detection of the total infection caused by the five viruses. *Talanta*, 2019, v. 195, pp. 739–744.

Материалы научных конференций

1. **Панфёров В.Г.**, Сафенкова И.В., Варицев Ю.А., Дренова Н.В., Корнев К.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы с усилением серебром для определения *Ralstonia solanacearum* в клубнях картофеля. Сборник материалов XXVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2016 г., Москва. С. 146.

2. **Панфёров В.Г.**, Сафенкова И.В., Варицев Ю.А., Дренова Н.В., Корнев К.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Высококочувствительная диагностика бурой гнили картофеля методом иммунохроматографии. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов». 15-17 марта 2016 г., Москва. С. 25.

3. Сафенкова И.В., **Панфёров В.Г.**, Бызова Н.А., Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Галушка П.А., Варицева Г.П., Усков А.Т., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессный иммунохимический мультианализ вирусных и бактериальных

патогенов картофеля. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов». 15-17 марта 2016 г., Москва. С. 27.

4. Safenkova I.S., Slutskaya E.S., **Panferov V.G.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Asymmetric flow field-flow fractionation for characterization of highly concentrated conjugates of gold nanoparticles and antibodies. Book of Abstracts of the 18th International Symposium on Flow- and Field Based Separations (FFF2016). May 22-26, 2016. Dresden, Germany. Th. P4.

5. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Efficient formats of lateral flow immunoassay: The use of magnetic nanoparticles and controllable cut-off-levels. Point-of-Care Diagnostics, May 10-11, 2017. Munich, Germany. Abstracts of the Conference. P. 100.

6. **Панферов В.Г.** Количественная характеристика единичных взаимодействий вирус-антитело и разработка иммунохимических мультиплексных систем детекции вирусных и бактериальных фитопатогенов. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: 19-25 июня 2017 г.: Направление подготовки 06.06.01 «Биологические науки». М.: МАКС Пресс, 2017. С. 42–45.

7. Razo S.C., **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double enhancement based lateral flow immunoassay for potato virus X detection. Biocatalysis-2017: Abstracts of 11th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”. June 25-30, 2017, Moscow region, Russian Federation. Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd., 2017. P. 190-191.

8. **Панферов В.Г.**, Сафенкова И.В., Разо Ш., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение магнитных частиц для иммунохроматографического анализа X вируса картофеля. Тезисы докладов Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г., Москва. М.: ГЕОХИ РАН. 2017. Рег. № 533. С. 124.

9. Safenkova I.V., **Panferov V.G.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhancing nanoparticle-based approaches for ultrasensitive immunoassays. Program and Abstract Book of the 9th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" including Russian-Hellenic workshop and school of young scientists. May 6-13, 2018. Heraklion, Crete, Greece. P. 28.

10. Сафенкова И.В., **Панфёров В.Г.**, Немченко Н.А., Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Варицева Г.П., Галушка П.А., Усков А.И., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая тест-система для одновременного кон-

троля десяти патогенов картофеля. Сборник трудов конференции «Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства картофеля». 09-10 июля 2018, Московская область. С. 232-245.

11. **Панфёров В.Г.**, Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка высокочувствительных методов иммунохроматографического анализа фитопатогенов вирусной и бактериальной природы. Актуальная биотехнология. № 3 (26). Материалы VI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Ялта, 16-20 сентября 2018 г., С. 555.

12. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., **Панфёров В.Г.**, Урусов А.Е., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка и апробация иммунохроматографических тест-систем для экспрессного контроля фитопатогенов. Международная научно-практическая конференция «Современные технологии и средства защиты растений – платформа для инновационного освоения в АПК России». Сборник материалов. Санкт-Петербург – Пушкин, 8-12 октября 2018 г. С. 29–31.

13. **Panferov V.G.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Approaches to decrease the detection limit of lateral flow immunoassay. Book of Abstracts of the 12th Conference in the Rapid Methods Europe (RME2018). 5-7 November, 2018, Amsterdam, the Netherlands. P. 84.