

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи



ПАНФЁРОВ ВАСИЛИЙ ГЕННАДЬЕВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ
С ВИРУСНЫМИ И БАКТЕРИАЛЬНЫМИ АНТИГЕНАМИ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКСПРЕССНЫХ МЕТОДОВ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИТОПАТОГЕНОВ**

03.01.04 Биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор
Дзантиев Б.Б.

кандидат биологических наук
Сафенкова И.В.

Москва-2019

Оглавление

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
1. Литературный обзор.....	7
1.1. Иммунохроматографический анализ.....	7
1.2. Факторы, определяющие предел обнаружения иммунохроматографического анализа	11
1.3. Подходы для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа	14
1.4. Мультиплексные и мультипороговые форматы иммунохроматографического анализа	26
1.5. Фитопатогены картофеля.....	29
2. Материалы и методы.....	36
2.1. Материалы и оборудование.....	36
2.2. Методы.....	38
3. Результаты и обсуждение.....	51
3.1. Характеристика фитопатогенов и иммунореагентов.....	51
3.2. Характеристика маркеров.....	66
3.3. Разработка иммунохроматографического анализа фитопатогенов.....	77
3.4. Разработка подходов для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа фитопатогенов.....	85
3.5. Разработка мультипорогового и мультиплексного иммунохроматографического анализа.....	116
3.6. Апробация и верификация тест-систем и подходов для снижения предела обнаружения	134
Заключение.....	136
Список литературы.....	137

Список сокращений

АСМ	атомно-силовая микроскопия
АФПП	асимметричное фракционирование в поле поперечных сил
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВСЛК	вирус скручивания листьев картофеля
ДЛСР	динамическое лазерное светорассеяние
ЗХВК	золотохлористоводородная кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХА	иммунохроматографический анализ
кл.	клетки
КОЕ	колониеобразующие единицы
мАт	моноклональные антитела
МЧ	магнитные частицы
НЧЗ	наночастицы золота
НЧЗ – Ат	конъюгат наночастиц золота с антителами
ПААГ	полиакриламидный гель
пАт	поликлональные антитела
ПО	предел обнаружения
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ттБСА	20 мМ Трис-буфере, рН=7,5, содержащий 1% БСА, 1% сахарозы, 0,1% азида натрия и 0,25% Твин-20
ФБС	фосфатный буфер солевой
ФБС-Т	фосфатный буфер солевой + 0,05% Тритон X-100
ЩФ	щелочная фосфатаза
EDC	1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид
BCIP	5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат
Dh	гидродинамический диаметр
NBT	нитросиний тетразолий хлорид
NHS	N-гидроксисукцинимид
ξ-потенциал	дзета-потенциал
X, S, M, АВК	X, S, M, A вирусы картофеля

Введение

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.

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 X 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 анализатов. 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.

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

1. Литературный обзор

1.1. Иммунохроматографический анализ

ИХА относится к группе иммунохимических методов, основанных на взаимодействии антител с антигеном и регистрации формирующихся иммунных комплексов [1]. ИХА совмещает принципы хроматографического разделения реагентов при движении пробы вдоль тест-полоски и высокоспецифичных иммунохимических взаимодействий [2]. В качестве неподвижного сорбента выступает пористая нитроцеллюлозная мембрана с адсорбированными иммунореагентами, специфично связывающимися с компонентами пробы. Разделение компонентов происходит в результате иммунохимических взаимодействий в пространственно-разделенных зонах.

Для реализации ИХА используют тест-полоски, состоящие из нескольких перекрывающихся мембран, отличающихся по структуре и свойствам. Представленная на рис. 1 комплектация тест-полоски является наиболее общей, описаны варианты как включения дополнительных компонентов (например, нанесение гидрофобных барьеров на нитроцеллюлозную мембрану [3]), так и сокращения их числа (исключение из комплектации стекловолоконной мембраны и нанесение пробы непосредственно на тест-полоску [4]).

Для определения низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений используют различные форматы иммуноанализа – конкурентный и «сэндвич» формат, соответственно [5]. Тест-полоска содержит одну или несколько тестовых и контрольных зон [6]. В тестовой зоне находятся специфичные к антигену антитела, в контрольной зоне – антивидовые антитела (или иммуноглобулин-связывающие белки – белок А, G). «Сэндвич» формат основан на формировании тройных иммунных комплексов (иммобилизованные антитела – антиген – меченое антитело). Меченые антитела применяют для детекции формирующихся комплексов в тестовой зоне. Наночастицы золота (НЧЗ) являются наиболее широко используемой меткой в ИХА [7]. Определение высокомолекулярных веществ (белки, полисахариды) и корпускулярных частиц (вирионы, бактериальные клетки), являющихся поливалентными антигенами (имеют большое число сайтов связывания с антителами – эпитопов), в «сэндвич» формате ИХА происходит благодаря участию двух и более эпитопов антигена во взаимодействии с антителами. Для «сэндвич» формата ИХА могут быть использованы антитела, взаимодействующие с одним эпитопом, если он представлен несколькими копиями в структуре антигена, стерически доступными для связывания с антителами (например, белки оболочки вируса [8], поверхностные компоненты клеточной стенки бактерий [9] и др.).

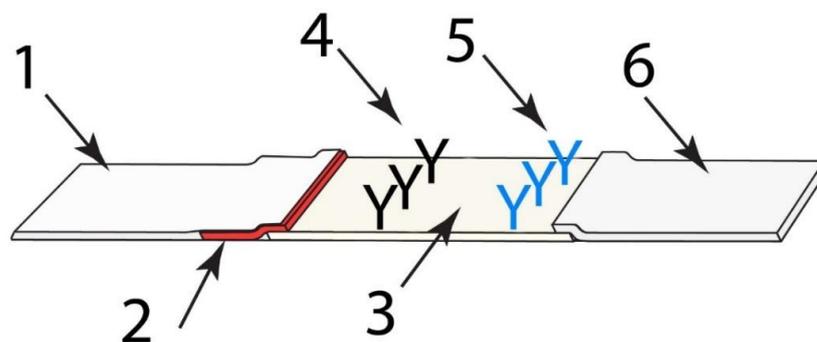


Рис. 1. Состав иммунохроматографической тест-полоски. 1 – впитывающая мембрана для пробы; 2 – стекловолоконная мембрана, содержащая адсорбированный конъюгат антител с маркером; 3 – рабочая мембрана; 4 – специфичные к антигену антитела в тестовой зоне; 5 – антивидовые антитела в контрольной зоне; 6 – конечная адсорбирующая мембрана

Иммунохроматографическая тест-полоска состоит из впитывающей мембраны, мембраны для конъюгата, рабочей мембраны и конечной адсорбирующей мембраны (см. рис. 1). Для удобства использования мембраны закрепляют на пластиковой подложке и нарезают на полоски шириной 3-5 мм [10].

Впитывающая мембрана обеспечивает миграцию анализируемой жидкой пробы. Также она может быть использована для частичной задержки компонентов матрикса и введения в систему дополнительных реагентов для снижения неспецифической адсорбции реагентов на мембранах – поверхностно-активных веществ, солей и др.

Мембрана для конъюгата используется для хранения конъюгата антител с маркером в высушенном виде. При миграции жидкости происходит вымывание конъюгата с мембраны. Такой способ позволяет избежать дополнительных стадий для введения конъюгата в систему [10].

Рабочая мембрана, на которой формируют тестовую и контрольную зоны, является ключевым элементом ИХА. Как правило, для анализа используют нитроцеллюлозные мембраны. Адсорбционная иммобилизация в тестовой и контрольной зонах основана на электростатических и гидрофобных взаимодействиях молекул белка с мембраной [11]. Основной характеристикой рабочей мембраны является скорость миграции жидкости. Для высокочувствительного анализа рекомендуется использовать мембраны с низкой скоростью миграции жидкости [12, 13].

Конечная адсорбирующая мембрана необходима для поддержания тока жидкости и впитывания несвязавшихся реагентов [10].

При погружении тест-полоски в анализируемую пробу под действием капиллярных сил происходит миграция жидкой пробы и иммунореагентов (рис. 2 А).

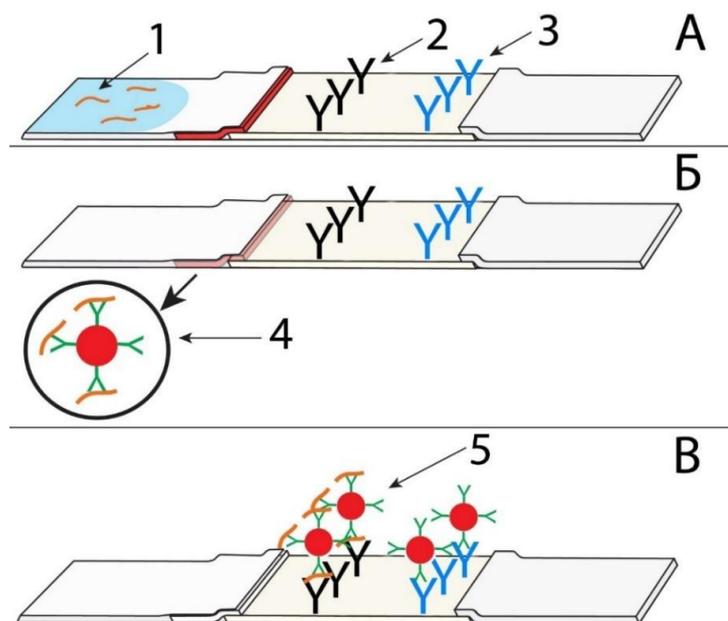


Рис. 2. Принцип ИХА в «сэндвич» формате. А – под действием капиллярных сил вдоль тест-полоски происходит миграция пробы. 1 – поливалентный антиген; 2 – адсорбированные антитела специфичные к антигену; 3 – адсорбированные антивидовые антитела; Б – формирование двойных иммунных комплексов антиген – конъюгат антител с маркером. 4 – структура двойного иммунного комплекса (антиген – конъюгат с меткой); В – формирование тройных иммунных комплексов в тестовой зоне. 5 – структура тройного иммунного комплекса (адсорбированные антитела – антиген – конъюгат с меткой)

Прохождение пробы через мембрану с высушенным конъюгатом вызывает его гидратацию и вымывание. Взаимодействие конъюгата с антигеном приводит к формированию двойных иммунных комплексов состава антиген – конъюгат антител с меткой (рис. 2 Б, 4). При миграции пробы по нитроцеллюлозной мембране иммобилизованные в тестовой зоне антитела взаимодействуют с двойными иммунными комплексами и формируют тройные иммунные комплексы (иммобилизованные антитела – антиген – конъюгат антител с меткой), что приводит к аккумуляции метки в тестовой зоне (рис. 2 В, 5) и развитию ее окрашивания [5]. Интенсивность окрашивания (интенсивность регистрируемого сигнала) тем выше, чем выше концентрация антигена в пробе, и, соответственно, чем большее количество метки накапливается в тестовой зоне. Конъюгаты, несвязавшиеся с антигеном, движутся мимо тестовой зоны и взаимодействуют с антивидовыми антителами в контрольной зоне. Формирование окрашенной контрольной зоны подтверждает достоверность анализа. Наличие окрашенных тестовой и контрольной зон свидетельствует о наличии антигена в пробе, наличие только одной контрольной зоны указывает на отсутствие антигена в пробе или его концентрацию меньше предела обнаружения (ПО) анализа. Если окрашивание контрольной зоны не происходит (вне

зависимости от окрашивания тестовой зоны), анализ считается недействительным и должен быть выполнен с использованием новой тест-полоски.

В отличие от других методов иммуноанализа (например, иммуноферментного анализа – ИФА), ИХА в классическом формате является одностадийным и не требует дополнительных промывок и добавления реагентов. ИХА находит широкое применение в различных областях – контроле качества и безопасности пищевых продуктов [14], ветеринарии, медицине, сельском хозяйстве [15]. Востребованность ИХА объясняется:

- простотой проведения анализа – погружение тест-полоски в пробу инициирует дальнейшие процессы, протекающие без участия пользователя. Все иммунореагенты (антитела и их конъюгаты с маркером) предварительно нанесены на мембраны или вносятся в пробу перед анализом [1]. Подготовка проб не требует специальных навыков и в зависимости от типа проб состоит в экстрагировании (измельчении твердого матрикса в буфере [16]) или разбавлении буфером.

- быстротой анализа – ИХА занимает от 5 до 15 минут в зависимости от свойств пробы и иммунореагентов. Проведение ИХА требует существенно меньше времени по сравнению с микробиологическими методами культивирования (более 24 часов), ИФА (1-3 часа), полимеразной цепной реакцией (ПЦР) (около 1 часа) [17]. Быстрота анализа позволяет проводить высокопроизводительный скрининг большого количества проб в ограниченное время.

- отсутствием потребности в стационарном оборудовании, что позволяет использовать ИХА в качестве внелабораторного метода [18].

- простотой интерпретации результатов – ИХА позволяет получить как качественные (наличие аналита определяется по присутствию/отсутствию окрашенной тестовой линии), так и количественные результаты (концентрация аналита определяется по интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне) [19].

- низкой стоимостью анализа по сравнению с альтернативными иммунохимическими и молекулярно-генетическими методами [5].

Несмотря на все преимущества ИХА, его применение ограничивают [20]:

- высокий предел обнаружения – ИХА не позволяет выявлять вещества в низких концентрациях, определяемых другими иммунохимическими (ИФА, иммунофлуоресцентный анализ) и молекулярно-генетическими (различные варианты ПЦР) методами [21].

- малая информативность – невозможность проведения бесприборного количественного анализа. ИХА в классическом формате позволяет проводить определение только одного антигена в пробе [6].

С учетом вышеизложенного, используются различные методические подходы, позволяющие снизить предел обнаружения, а также повысить информативность ИХА.

1.2. Факторы, определяющие предел обнаружения иммунохроматографического анализа

Предел обнаружения ИХА в «сэндвич» формате зависит от свойств пробы (влияние компонентов матрикса [22] и эффективность экстракции), аффинности антител [5], характеристик маркера [7] и мембранного носителя (рис. 3).

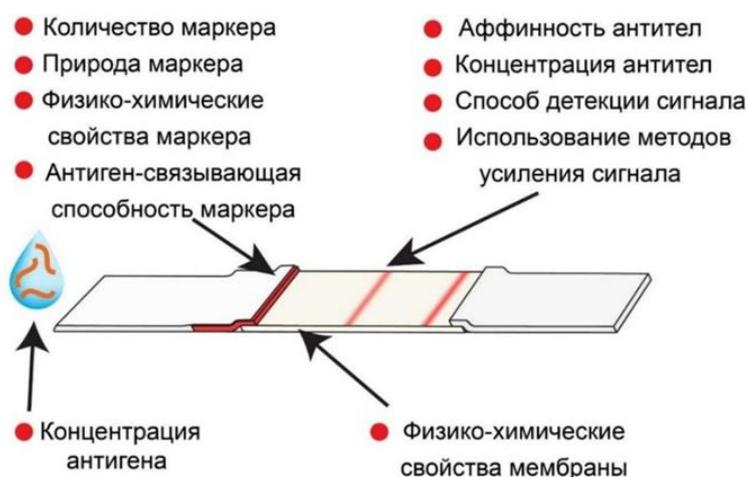


Рис. 3. Факторы, влияющие на предел обнаружения ИХА

Оптимизация ИХА заключается в выборе условий (количество маркера, антител и свойств мембран [23]), обеспечивающих минимальный ПО. Однако ряд факторов (например, аффинность используемых антител и их конъюгатов) не могут меняться и являются свойствами используемых иммунореагентов. Часто даже после оптимизации условий анализа ПО оказывается недостаточным. Формирование в тестовой зоне тройных иммунных комплексов (иммобилизованные антитела – антиген – конъюгат антител с меткой) является ключевым этапом, определяющим интенсивность регистрируемого сигнала и ПО (рис. 4).

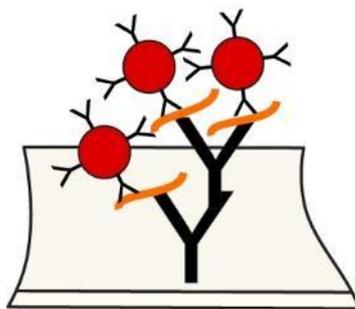


Рис. 4. Структура тройного иммунного комплекса в тестовой зоне

Прямым путем, приводящим к снижению предела обнаружения ИХА, являются следующие действия [20]:

- увеличение количества иммунных комплексов в тестовой зоне;
- использование маркера, определяемого в минимальных количествах.

1.2.1. Эффективность детекции маркера

Эффективность детекции определяется свойствами самого маркера (химическая природа, размер и форма частиц и др.) [5, 7] и способом регистрации сигнала [19]. Влияние свойств маркера на предел обнаружения ИХА подробнее обсуждается в разделе 1.3.1. В данном разделе будут рассмотрены основные способы регистрации сигнала в ИХА и возможности их использования во внелабораторных условиях.

Оптические методы регистрации сигнала являются наиболее широко используемыми в ИХА. Колориметрическая регистрация сигнала основана на количественном определении интенсивности сигнала в тестовой зоне. Окрашивание зоны обусловлено формированием иммунных комплексов и концентрированием маркера – НЧЗ [5], магнитных [24], латексных частиц [25] и других окрашенных маркеров [7]. Качественная оценка (наличие/отсутствие окрашивания тестовой зоны) может быть проведена невооруженным глазом. Однако в ряде случаев необходим количественный результат [15]. Для этого сравнивают интенсивности сигналов в тестовых зонах после анализа пробы и калибраторов с известной концентрацией антигена. Для количественной колориметрической регистрации сигнала предложен ряд подходов, основанных на использовании офисных сканеров, специальных фотометрических детекторов [19], смартфонов [26]. Наибольший интерес для внелабораторной диагностики представляют компактные и недорогие детекторы. Колориметрическая регистрация сигнала является наиболее простым способом количественной оценки результатов ИХА. Основные недостатки – недостоверная регистрация низких интенсивностей сигнала при малых концентрациях антигена в пробе, сложность регистрации сигнала после анализа в окрашенных пробах (например, в крови).

Альтернативные методы позволяют достоверно детектировать маркер даже после анализа окрашенных матриц. Для регистрации флуоресцентного сигнала в ИХА [27] в качестве меток используют полупроводниковые квантовые точки [28], углеродные квантовые точки [29], меченные флуорофором латексы [30], флуоресцирующие органические молекулы [31]. Недостаточная интенсивность колориметрического и флуоресцентного сигналов в тестовой зоне может быть обусловлена не только накоплением малого количества метки, но и особенностями мембранного носителя. Распределение нанесенных иммунореагентов, а также миграция анализируемой пробы происходит по всей толщине пористой мембраны (около 100-300 мкм), однако основной вклад в регистрируемый сигнал вносят маркеры в верхних 10 мкм мембраны [32]. Оптический сигнал от маркера, расположенного ниже 10 мкм, регистрируется значительно хуже.

Для решения данной проблемы предложен подход, основанный на регистрации магнитных свойств маркера по всей толщине тест-полоски [33] с помощью магнетометра [34]. Кроме того, компоненты биологических проб, как правило, не обладают магнитными свойствами, что позволяет снизить величину фона.

Однако, несмотря на описанные выше преимущества различных вариантов регистрации сигнала и прогресс в области портативных детекторов [19], наиболее применимым для практики остается визуальный метод регистрации колориметрического сигнала. В большинстве коммерчески доступных тест-систем используется данный подход.

1.2.2. Характеристика антител

Аффинность и специфичность антител являются одними из ключевых факторов, определяющих предел обнаружения ИХА. Поскольку биорецепторные взаимодействия (антиген – антитело и антиген – конъюгат) в ИХА происходят в неравновесных условиях, количество иммунных комплексов в тестовой зоне зависит от кинетических констант иммунохимических реакций.

Математическое описание взаимодействий антиген – антитело в ИХА является сложным, поскольку на формирование иммунных комплексов оказывает влияние ряд факторов – ориентация антител в тестовой зоне и на поверхности маркера, экранирование антигенсвязывающих фрагментов, отличия локальных участков мембраны по пористости, гидрофильности, сорбционной емкости и др. (рис. 5) [35]. Все эти факторы приводят к снижению количества молекул антител, способных связывать антиген, а также изменяют аффинность биорецепторных взаимодействий. Экспериментальная оценка количества антител в составе конъюгата и на тест-полоске, способных реагировать с антигеном, является методически сложной задачей, при решении которой принимается ряд допущений.

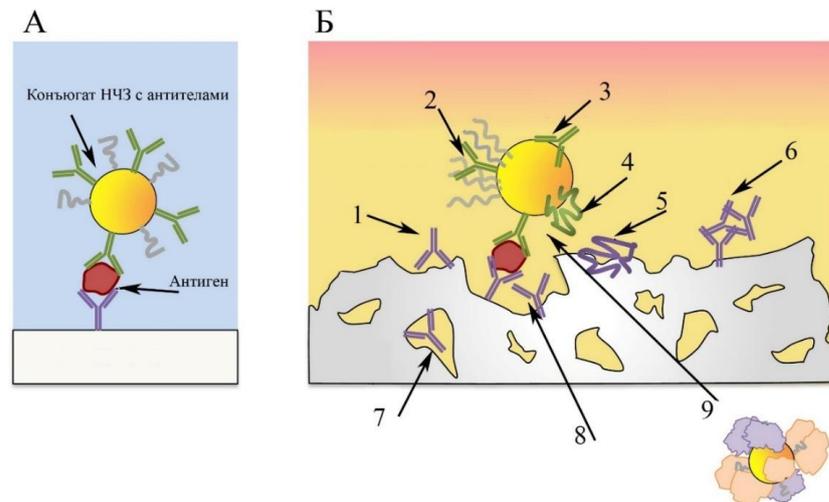


Рис. 5. Формирование тройного иммунного комплекса в тестовой зоне в «сэндвич» формате ИХА – модельное (А), с учетом различных факторов, влияющих на иммунохимические взаимодействия (Б): 1 – ориентация антител на мембране, приводящая к блокированию антигенсвязывающих участков; 2 – блокирование антигенсвязывающих участков на поверхности конъюгата из-за адсорбции компонентов матрикса; 3 – ориентация антител на поверхности наночастиц маркера, приводящая к блокированию антигенсвязывающих участков; 4 – денатурация антител на поверхности маркера; 5 – денатурация антител на поверхности мембраны; 6 – полислойная адсорбция антител на поверхности мембраны; 7 – блокирование антигенсвязывающих участков при адсорбции антител на поверхность пористой мембраны; 8 – блокирование антигенсвязывающих участков антител при плотной адсорбции на поверхности мембраны; 9 – блокирование антигенсвязывающих участков на поверхности конъюгата вследствие адсорбции компонентов пробы [35]

При всей сложности процессов, протекающих при взаимодействии иммунореагентов в потоке, скорость ассоциации антиген – антитело можно назвать ключевой характеристикой, влияющей на формирование комплексов [36]. Для снижения ПО необходимы условия, обеспечивающие формирование наибольшего количества иммунных комплексов за ограниченное время миграции пробы по тест-полоске. Для практической реализации данных требований необходимо использовать антитела с большей константой скорости ассоциации или увеличивать время взаимодействия иммунореагентов с антигеном. Для увеличения времени взаимодействия в ИХА может быть использована предварительная инкубация конъюгата с пробой [37], а также замедление скорости миграции жидкости вдоль мембраны [3].

1.3. Подходы для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа

Применение методических подходов для снижения предела обнаружения ИХА приводит к увеличению как специфического (обусловленного формированием иммунных комплексов), так и фонового (обусловленного неспецифической адсорбцией

иммунореагентов) регистрируемого сигнала [38]. Необходима оптимизация условий, обеспечивающих наименьший фоновый сигнал (или максимальное соотношение специфичного и фонового сигналов). Кроме того, разрабатываемые подходы не должны усложнять анализ и увеличивать его время проведения.

В работах Ye и Xia [21] и Zhou и соавт. [39] суммированы различные подходы для снижения предела обнаружения ИХА. Возможность их использования и достигаемое снижение ПО определяется свойствами матрикса, маркера и иммунореагентов. Проведенный анализ литературных данных позволяет предложить классификацию методических подходов для снижения предела обнаружения ИХА, основанных на увеличении регистрируемого сигнала (амплификации сигнала) в тестовой зоне. В зависимости от механизма они могут быть разделены на три группы (рис. 6):

- подходы, основанные на использовании более эффективных маркеров;
- подходы, основанные на каталитических свойствах маркера;
- подходы, основанные на увеличении количества маркера в тестовой зоне

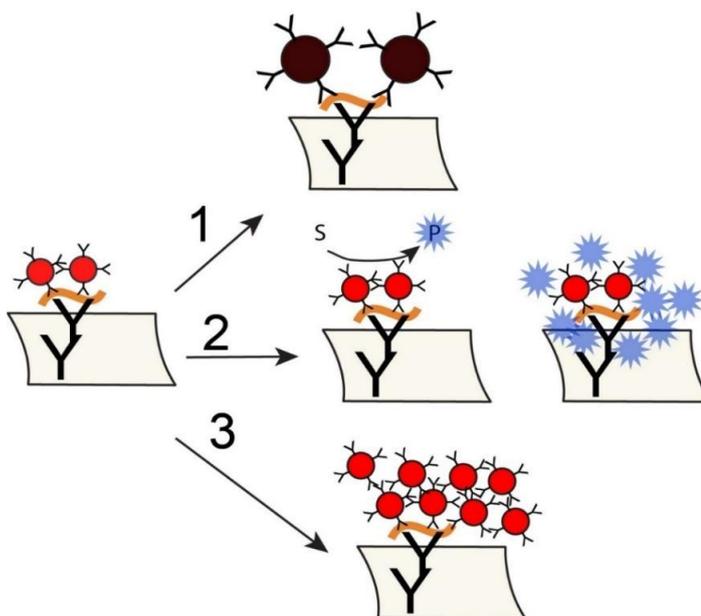


Рис. 6. Основные подходы для снижения предела обнаружения ИХА. На рисунке представлен «сэндвич» комплекс в тестовой зоне тест-полоски и его модификации при использовании: 1 – более эффективных маркеров; 2 – каталитических свойств маркера (S – субстрат, P – продукт реакции); 3 – увеличения количества маркера

1.3.1. Выбор более эффективных маркеров

Наиболее широко в качестве маркера в ИХА используют наночастицы различной природы [7]. Ниже представлены основные нанодисперсные маркеры и их свойства, влияющие на предел обнаружения ИХА.

1.3.1.1. Наночастицы золота

НЧЗ являются самым распространенным маркером как в коммерческих тест-системах [10], так и в научных разработках [39], что объясняется простыми протоколами синтеза и конъюгации с биомолекулами и уникальными оптическими свойствами [40]. Эффективность регистрации НЧЗ в тестовой зоне определяется коэффициентом экстинкции, который зависит от размера [41] и формы частиц [42]. При повышении размера НЧЗ происходит непропорциональное увеличение молярного коэффициента экстинкции, что позволяет достигнуть большей интенсивности окрашивания при равном количестве частиц. В работе Liu и соавт. [41] показано возрастание коэффициента молярной экстинкции в 3,3 и 7 раз при увеличении диаметра НЧЗ с 20,6 до 25,7 и 34,5 нм. Для НЧЗ с диаметром 40, 60 и 80 нм коэффициент молярной экстинкции возрастает в 9, 35 и 87 раз по сравнению с частицами с диаметром 20 нм [43].

Однако, несмотря на большую величину оптического сигнала, применение крупных НЧЗ (более 40-50 нм) в качестве маркера в ИХА не приводит к увеличению предела обнаружения. Safenkova и соавт. показали немонотонную зависимость предела обнаружения ИХА X вируса картофеля (ХВК) от размера НЧЗ [23]. При повышении диаметра НЧЗ с 6,4 до 33,4 нм ПО уменьшался с 80 до 3 нг/мл. Однако дальнейшее увеличение диаметра НЧЗ до 52 нм приводило к росту ПО до 9 нг/мл. Сходные данные по влиянию размера НЧЗ на предел обнаружения ИХА были получены в работе Cui и соавт. [44]. Предел обнаружения ИХА *Escherichia coli* O157:H7 для конъюгата антител с НЧЗ (НЧЗ – Ат) диаметром 35 нм был на порядок меньше по сравнению с ИХА с 20 нм НЧЗ. Использование для конъюгации с антителами НЧЗ с диаметром 54 нм приводило к увеличению ПО из-за стерических затруднений при взаимодействии иммобилизованных антител с антигеном [44]. Ограниченная миграция конъюгата вдоль пористой тест-полоски также лимитирует использование НЧЗ с размером более 50 нм для синтеза конъюгатов НЧЗ – Ат [1]. Кроме того, емкость мембран не позволяет использовать крупные НЧЗ в тех же мольных количествах, что и мелкодисперсные частицы.

В качестве замены крупных сферических НЧЗ могут применяться несферические НЧЗ (нанозвезды, наностержни, наноцветы и т.д.), обладающие бóльшим коэффициентом молярной экстинкции [42], и как следствие, большей интенсивностью окрашивания при равном количестве частиц по сравнению со сферическими мелкодисперсными НЧЗ. В работе Serebrennikova и соавт. [45] показано, что использование в качестве маркера наноцветов золота (диаметр частиц около 100 нм) позволило снизить предел обнаружения ИХА прокальцитонина в 5 раз по сравнению со сферическими НЧЗ (диаметр – 20 нм). В работе Ji и соавт. [46] использование наноцветов золота в качестве маркера приводило к

снижению ПО афлатоксина В1 в 10 раз по сравнению с ИХА со сферическими НЧЗ. В работе Zhang и соавт. [47] установлено влияние формы наночетов золота на интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала в тестовой зоне. Предел обнаружения ИХА *E. coli* O157:H7 в случае наночетов золота был на два порядка ниже (10^3 колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл) по сравнению со сферическими НЧЗ (10^5 КОЕ/мл). В отличие от сферических НЧЗ (максимум поглощения – 520 нм), наночеты золота обладают темно-синей окраской (максимум поглощения – 620 нм) и формируют более контрастную тестовую зону, что облегчает визуальную регистрацию. Показана возможность совместного использования сферических и несферических НЧЗ с разной окраской для мультиплексного ИХА микотоксинов [48], пищевых аллергенов [49].

Рассмотренные выше подходы, основанные на использовании крупных и несферических НЧЗ, перспективны для высокочувствительного анализа. Однако на сегодняшний день сферические НЧЗ с диаметром около 30 нм используются в преобладающем количестве тест-систем. Разработка методических подходов для снижения предела обнаружения ИХА с использованием сферических НЧЗ данного размера является актуальной задачей.

1.3.1.2. Магнитные частицы

Используемые в качестве маркеров в ИХА магнитные частицы (МЧ) имеют различную форму и размер (от десятков нанометров до микрон), и состоят из железа, никеля, кобальта или их оксидов, которые могут быть стабилизированы адсорбированными на поверхности молекулами или включением частиц в полимерные матрицы [50]. Магнитные свойства определяются размером частиц – мелкие частицы (1-10 нм) парамагнитны, более крупные – ферромагнитны. Благодаря магнитным свойствам МЧ могут быть сепарированы из жидкой пробы под действием внешнего магнитного поля. Данное свойство было использовано в различных форматах иммуноанализа для удаления компонентов матрикса, а также концентрирования антигена, связанного с конъюгатом антител и МЧ [33].

Для конъюгации МЧ с биомолекулами могут быть использованы методы физической адсорбции, ковалентной иммобилизации и связывания за счет аффинных взаимодействий. Наиболее широко используются методы ковалентной иммобилизации [33, 51]. Для этого МЧ модифицируют амфифильными молекулами или включают при синтезе в их состав различные полимеры (полиэтиленгликоль, полиметакриловая кислота, агароза, хитозан и т.д.) с функциональными группами [51]. В зависимости от распределения компонентов выделяют четыре типа частиц – магнитные частицы в оболочке, магнитные частицы в полимерной матрице, полимерная матрица с магнитными частицами на

поверхности, магнитные частицы с отдельными полимерными молекулами на поверхности [33].

Ключевой характеристикой, определяющей применение МЧ в ИХА, является их размер. В работе Yan и соавт. [34] показано, что использование крупных МЧ (около 1 мкм) в качестве маркера ограничено из-за плохой миграции по пористой мембране. МЧ меньшего размера (100-200 нм) могут быть успешно использованы в качестве метки в ИХА. В работе Liu и соавт. [24] исследовано влияние размера МЧ на интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала в тестовой зоне для ИХА афлатоксина М1. Наибольшая величина сигнала была достигнута для частиц с размером 180 нм. Снижение сигнала для крупных (500 нм) и мелких (80 нм) МЧ авторы объясняют затрудненной миграцией в пористых мембранах и меньшей интенсивностью окрашивания частиц, соответственно.

МЧ в качестве метки в ИХА обладают двумя основными преимуществами:

- концентрирование антигена для снижения ПО. В работе Li и соавт. [52] показано, что при десятикратном магнитном концентрировании *E. coli* из пищевых матрицсв ПО был в 100 раз ниже благодаря удалению компонентов пробы.
- два способа регистрации на тест-полоске. МЧ могут регистрироваться не только визуально [53], но и с использованием магнетометров [34]. Регистрация магнитных свойств позволяет существенно снизить неспецифический сигнал в биологических пробах и выявлять малые количества маркера по всей толщине тест-полоски.

1.3.1.3. Квантовые точки

Квантовые точки представляют собой неорганические люминесцентные наночастицы полупроводниковой природы (InP, InAs, GaAs, GaN, ZnS, ZnSe, CdTe и др.) Спектр флуоресценции квантовых точек зависит от состава и размера частиц [54]. Квантовые точки характеризуются высокой фотохимической стабильностью и интенсивностью флуоресценции [55]. Для конъюгации с рецепторными биомолекулами поверхность квантовых точек модифицируют различными веществами с функциональными группами [56].

При использовании квантовых точек в качестве маркера в ИХА снижение ПО обусловлено высокой интенсивностью регистрируемого сигнала, позволяющей регистрировать меньшие количества маркера в тестовой зоне. В работе Taranova и соавт. [28] использование квантовых точек позволило снизить ПО трех антибиотиков в 80-200 раз по сравнению с ИФА. Согласно данным Taranova и соавт. [57], ПО хлорамфеникола в ИХА с квантовыми точками в виде метки оказался в 24 раза ниже по сравнению с ИХА с использованием НЧЗ.

В качестве альтернативы дорогостоящим квантовым точкам могут быть использованы углеродные квантовые точки. Флуоресцентные свойства углеродных квантовых точек зависят от использованных для синтеза углеродсодержащих соединений [58]. Их главными преимуществами являются низкая стоимость и простота получения [59]. В некоторых работах показано, что углеродные квантовые точки являются частицами с размером до 7 нм [60, 61]. По данным Shi и соавт. [62] и Zhu и соавт. [63] они представляют собой низкомолекулярные продукты деградации органических прекурсоров. Отмечается высокая гетерогенность препаратов по размеру и по флуоресцентным свойствам [64].

Главным недостатком ИХА с квантовыми точками различной природы в качестве маркера является необходимость использования дополнительного оборудования (источник возбуждающего света и детектор).

1.3.1.4. Латексные частицы

Латексные частицы были использованы в качестве маркера в первом коммерческом ИХА для определения хорионического гонадотропного гормона человека (раннего выявления беременности) в 1988 году (Clearblue 1-step) [65]. Латексные частицы состоят из полистирола, полиметилметакрилата и других полимерных материалов. В зависимости от условий синтеза диаметр сферических частиц варьирует в диапазоне от нано- до микрометров. Функциональные группы на поверхности позволяют конъюгировать их с биомолекулами разной природы [66]. Основные преимущества латексных частиц – низкая стоимость и возможность получения различной окраски посредством импрегнирования красителей при полимеризации или их ковалентного присоединения к поверхности.

Lee и соавт. [67] разработали ИХА с красными и синими латексными частицами для одновременного выявления специфичных IgG и IgM антител к вирусам Эбола и Чикунгунья. Мао и соавт [68] использовали синие латексные частицы для определения модельной последовательности ДНК. В работе Таганова и соавт. [57] показано, что предел обнаружения ИХА хлорамфеникола с использованием латексных частиц оказался в 8 раз ниже по сравнению с ИХА с НЧЗ.

1.3.2. Каталитические свойства маркера

Каталитические свойства маркера или иммобилизованных на нем ферментов могут быть использованы для снижения предела обнаружения ИХА [39]. Рост интенсивности регистрируемого сигнала в таких системах основан на увеличении количества регистрируемого продукта, образующегося в ходе реакции, катализируемой либо самим маркером [69], либо конъюгированными с ним ферментами [70].

1.3.2.1. Восстановление солей металлов на наночастицах золота

Восстановление солей золота и серебра на поверхности НЧЗ такими соединениями как гидрохинон, метол, глутатион и т.д. приводит к формированию крупных частиц, имеющих значительно большую интенсивность окрашивания по сравнению с исходными. Метод, основанный на восстановлении солей серебра (серебряное усиление), используется в различных биоаналитических системах [71, 72]. Изначально данный метод применялся в иммуногистохимии для локализации и лучшей визуализации конъюгатов НЧЗ [73]. Для увеличения интенсивности колориметрического сигнала тестовой зоны данный подход впервые был использован в работе Yang и соавт. [74] для ИХА токсичного белка – абрина-а. Авторы показали 100-кратное снижение ПО относительно традиционного формата ИХА. Формирующиеся вокруг НЧЗ крупные агломераты серебра [75] имеют высокую интенсивность окрашивания и приводят к возникновению темноокрашенной контрастной зоны на светлом фоне нитроцеллюлозной мембраны [38]. Данный подход был использован для снижения предела обнаружения ИХА различных аналитов: фумонизина В1 и дезоксиниваленола [76], кадмия [77], ХВК [78], антигенов *Helicobacter pylori* [79], охратоксина А [80] и др.

Для достижения наибольшего увеличения интенсивности регистрируемого оптического сигнала и минимального фона в работе Anfossi и соавт. [80] проведена оптимизация концентраций солей серебра, восстановителя и времени амплификации. Наибольший рост сигнала был достигнут при 10-минутной инкубации на тест-полоске раствора с 0,3% нитрата серебра и 3% гидрохинона. Увеличение времени инкубации или повышение концентрации реагентов приводило к росту фонового окрашивания. В работе Rodríguez и соавт. [81] показано влияние способа введения солей серебра и восстановителя на увеличение интенсивности сигнала в тестовой зоне и фонового окрашивания. Для проведения серебряного усиления через тест-полоску пропускали смесь нитрата серебра и гидрохинона или накладывали на тестовую зону стекловолоконные мембраны с предварительно нанесенными и высушенными реагентами и инициировали реакцию добавлением воды. Показано, что при пропускании смеси нитрата серебра и гидрохинона ПО снижается в 2 раза больше по сравнению с использованием стекловолоконных мембран. В работе Бызова и соавт. [79] внесение реагентов для серебряного усиления с помощью стекловолоконных мембран позволило достичь высокой амплификации сигнала и минимального фона.

Для практического применения востребованы комплектации, позволяющие проводить усиление без использования жидких реагентов с минимальным количеством стадий. Предложенная Yang и соавт. [74] амплификация со стекловолоконными

мембранами является наиболее перспективным вариантом. Серебряное усиление характеризуется значительным увеличением интенсивности окрашивания, занимает мало времени (от 3 до 10 минут) и может быть использовано для всех тест-систем с НЧЗ в качестве маркера. Недостатками данного подхода являются низкая стабильность исходных реагентов [81], необходимость удаления хлорид- и фосфат-ионов (компоненты матрикса) из-за образования малорастворимых солей серебра, приводящих к существенному снижению эффективности усиления.

В ряде работ показано, что НЧЗ являются центрами восстановления ЗХВК в присутствии гидросиламина [82], пероксида водорода [83], бромид цетилтриметиламмония и аскорбиновой кислоты [84]. Восстановление ЗХВК на поверхности НЧЗ приводит к увеличению размера частиц (золотое усиление) [85]. Данный подход был использован Lap и соавт. [82] для снижения ПО мультиплексного анализа пестицидов с использованием иммуночипов. В работе Dias и соавт. [83] показано использование золотого усиления для снижения ПО иммунофильтрационного анализа с различными маркерами – НЧЗ, МЧ, наночастицами серебра, частицами диоксида кремния. По данным авторов, амплификация сигнала, основанная на восстановлении ЗХВК в присутствии 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES буфер) и пероксида водорода, позволяет снизить предел обнаружения IgG в 100 раз.

Методический подход для повышения интенсивности сигнала в тестовой зоне, основанный на увеличении размера НЧЗ при восстановлении ЗХВК, имеет ряд преимуществ по сравнению с серебряным усилением – возможность амплификации в присутствии хлорид- и фосфат ионов без дополнительных отмывок [86], быстрота амплификации [87] и высокая стабильность усиливающих реагентов [83].

1.3.2.2. Каталитические свойства нанозимов

Для обозначения наночастиц металлов, обладающих каталитическими свойствами, используется термин «нанозим». В настоящее время известны нанозимы различной природы (частицы металлов – серебро, золото, медь, железо, платина и др. и их производные) с пероксидазо-, оксидазо-, каталазо- и супероксиддисмутадо-подобными активностями [69]. Основными достоинствами нанозимов являются высокая стабильность в широком диапазоне температур, рН среды и органических растворителей, меньшая стоимость по сравнению с ферментами, возможность многократного использования [88]. Одним из основных факторов, определяющих каталитическую активность нанозимов, является размер частиц. Для нанозимов различной химической природы показано увеличение каталитической активности при снижении размера частиц [89-91].

Нанозимы различной природы используются для снижения предела обнаружения ИХА. В работе Zhao и соавт. [92] показано, что использование в качестве маркера наночастиц берлинской лазури приводило к 5-кратному снижению предела обнаружения ИХА кленбутерола. Наночастицы берлинской лазури в тестовой и контрольной зонах регистрировали по оптическим свойствам без проведения каталитической реакции. В работе S.L. Loynachan и соавт. [93] были использованы наночастицы, содержащие ядро из НЧЗ, покрытое наночастицами платины. Использование пероксидазо-подобных свойств данных частиц позволило снизить предел обнаружения ИХА белка р24 (маркер вируса иммунодефицита человека) в 100 раз по сравнению с колориметрической регистрацией. В работе Zhang и соавт. [94] представлен ИХА *Enterobacter sakazaki* с использованием пероксидазо-подобных свойств наночастиц оксида железа. Окисление 3,3'-диаминобензидина в присутствии пероксида водорода приводит к формированию окрашенного нерастворимого продукта и существенному повышению интенсивности колориметрического сигнала в тестовой зоне. Показано, что тест-система способна определять до 10 КОЕ/мл. Duan и соавт. [95] продемонстрировали использование каталитических свойств маркера (конъюгата МЧ с антителами) для снижения предела обнаружения ИХА вируса Эболы. Увеличение окраски тестовой зоны основано на реакции окисления 3,3'-диаминобензидина, катализируемой МЧ, и приводящей к накоплению регистрируемого продукта. Использование данного подхода позволило снизить ПО в 100 раз по сравнению с традиционным ИХА с НЧЗ в качестве маркера.

Ограничение использования нанозимов для снижения предела обнаружения ИХА обусловлено адсорбцией компонентов матрикса на поверхности частиц, приводящей к снижению каталитической активности из-за уменьшения площади свободной поверхности [95]. Такой же эффект наблюдается при модификации поверхности МЧ различными соединениями для конъюгации [96]. Для использования МЧ и других нанозимов в качестве маркера с каталитическими свойствами необходимо оптимизировать подходы поверхностной модификации рецепторными биомолекулами.

1.3.2.3. Каталитические свойства ферментных меток

Применение ферментов в ИХА впервые было показано в работе Zuk и соавт. [97] в 1985 г. Для ИХА теofilлина совместно использовали глюкозооксидазу и пероксидазу. В качестве субстратного раствора применяли смесь глюкозы и 4-хлоро-1-нафтола. Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы до глюконовой кислоты и пероксида водорода. Пероксидаза катализирует окисления 4-хлоро-1-нафтола в присутствии пероксида водорода, приводящую к накоплению темноокрашенного нерастворимого продукта. В работе Cho и соавт. [98] представлен ИХА с пероксидазным усилением для

определения антигена вируса гепатита В. Авторы использовали конъюгат антиген-специфичных антител с пероксидазой, в тестовой зоне были иммобилизованы антиген-специфичные антитела. После проведения ИХА добавляли субстратный раствор (0,003% пероксид водорода + 0,01 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ)). Продукт ферментативной реакции обладает синей окраской, однако из-за растворимости размывается по тест-полоске и затрудняет интерпретацию результатов. Для получения нерастворимых продуктов к ТМБ добавляют высокомолекулярные вещества (сульфат декстрана, альгинат и др. [99]). В работе Samsonova и соавт. [100] использование пероксидазного усиления позволило снизить предел обнаружения ИХА прогестерона в молоке в 30 раз. В работе Cho и соавт. [101] показано, что пероксидазное усиление приводило к снижению ПО на три порядка (до 100 КОЕ/мл *E. coli* O157:H7).

Несмотря на значительное увеличение интенсивности окрашивания тестовой зоны, пероксидаза не может быть использована для анализа препаратов с эндогенной пероксидазной активностью. Пероксидазы, присутствующие в растительном экстракте, приводят к накоплению окрашенного продукта ферментативной реакции даже в случае отсутствия антигена в пробе (ложноположительный результат анализа).

В таких случаях для замены пероксидазы могут использоваться другие ферменты. Щелочная фосфатаза (ЩФ) имеет меньшее распространение в анализируемых пробах по сравнению с пероксидазой, поэтому может рассматриваться как более универсальный фермент для снижения предела обнаружения ИХА. Известно лишь небольшое число публикации об использовании ЩФ в ИХА [102-104]. Однако авторы не сравнивали пределы обнаружения ИХА с ЩФ и классического анализа с НЧЗ в качестве маркеров. В работе Lathwal и Sikes [105] показано, что для ИФА с бумагой в качестве носителя применение ЩФ позволяет получить минимальный неспецифический сигнал и наименьший ПО белка *Plasmodium falciparum* по сравнению с другими методами амплификации (амплификация сигнала с использованием пероксидазы, серебряное усиление, полимеризация прекурсоров, приводящая к окрашиванию). Однако предложенный авторами формат анализа требует отмывки, добавления реагентов и других дополнительных манипуляций, являясь многостадийным и время затратным (около 60 минут).

Применение ферментативного подхода ограничено эндогенной каталитической активностью пробы и присутствием в ней ингибиторов. Кроме того, эффективность амплификации сигнала в ИХА может быть недостаточна из-за низкой стабильности ферментов [106]. Предложены различные способы стабилизации ферментов для использования в биоаналитических системах [107]. Для ИХА наиболее перспективны простые способы, основанные на иммобилизации ферментов на поверхность мембран или

наночастиц при добавлении различных стабилизаторов – детергентов, этилендиаминтетрауксусной кислоты [108], моно- и дисахаридов [109] и др.

1.3.3. Увеличение количества маркера в иммунных комплексах

Низкий регистрируемый сигнал в тестовой зоне часто является следствием малого количества маркера. Повышение количества маркера в составе иммунных комплексов способствует увеличению регистрируемого сигнала и снижению ПО анализа. В зависимости от механизма увеличения количества маркера, можно выделить два основных подхода, основанных на:

- включении в состав комплекса больших концентраций маркера (сборка крупных агрегатов);
- использовании частиц-носителей, включающих большое количество регистрируемого маркера.

Подход, основанный на включении в состав иммунного комплекса больших концентраций маркера, приводит к формированию крупных агрегатов в тестовой зоне и позволяет увеличить интенсивность оптического сигнала. Описаны подходы, основанные на использовании двух конъюгатов НЧЗ, взаимодействующих друг с другом за счет специфических реакций между иммобилизованными на их поверхности реагентами: биотин – стрептавидин [110], антитело – антивидовое антитело [111], антитело – антиген [112]. Для реализации данных подходов используют взаимодействующие друг с другом конъюгаты: первичный конъюгат (НЧЗ – Ат), вторичный конъюгат, специфично взаимодействующий с первичным конъюгатом НЧЗ. Взаимодействие конъюгатов может происходить при предварительной инкубации в растворе [111], в потоке при совместной миграции по тест-полоске [110] или при их последовательном пропускании вдоль тест-полоски [81]. Степень снижения ПО отличается для разных систем. При использовании одного первичного и вторичного конъюгата в работе Rodríguez и соавт. [81] предел обнаружения ИХА простат-специфического антигена оказался в 2,5 раза ниже по сравнению с ИХА только с одним первичным конъюгатом. В работе Chen и соавт. [111] такой же подход позволил снизить предел обнаружения *E.coli* O157:H7 в 100 раз. Сочетание одного первичного конъюгата (НЧЗ – биотинилированные антитела к прокальцитонину) и двух вторичных (НЧЗ – биотинилированный бычий сывороточный альбумин (БСА) и НЧЗ – стрептавидин) впервые было применено в работе Taganova и соавт. [110]. Использование одного вторичного конъюгата (НЧЗ – стрептавидин), взаимодействующего с первичным конъюгатом (НЧЗ – биотинилированные антитела к прокальцитонину), хотя и приводило к увеличению интенсивности окрашивания тестовой зоны в 1,5-2 раза, но не снижало ПО. Введение в систему дополнительного вторичного конъюгата (НЧЗ – биотинилированный

БСА), взаимодействующего с конъюгатом НЧЗ – стрептавидин, позволило снизить визуальный и инструментальный пределы обнаружения прокальцитонина в 10 и 30 раз, соответственно. Для снижения предела обнаружения ИХА нуклеиновых кислот Toubanaki и соавт. [113] оптимизировали размер НЧЗ в составе конъюгатов. Анализ основан на взаимодействии биотинилированных олигонуклеотидов с конъюгатом НЧЗ – Ат против биотина. Для усиления использовали вторичный конъюгат НЧЗ, специфично связывающийся в тестовой зоне. Наибольшая интенсивность сигнала достигалась при диаметре НЧЗ равном 30 нм для первичного конъюгата и 10 нм для вторичного конъюгата. Предел обнаружения ИХА модельной последовательности нуклеиновой кислоты с двумя конъюгатами НЧЗ был на порядок ниже (0,05 фМ) по сравнению с ИХА с одним конъюгатом. В работе Choi и соавт. [114] показано, что агрегация с вторичным конъюгатом (НЧЗ – Ат против БСА) позволила снизить предел обнаружения ИХА тропонина I в 100 раз. Наименьший ПО был достигнут при использовании НЧЗ с диаметром 10 нм для первичного (НЧЗ – Ат против тропонина с добавлением БСА) и 40 нм для вторичного конъюгата. При увеличении диаметра частиц вторичного конъюгата до 60 нм происходит снижение регистрируемого сигнала в тестовой зоне. Немонотонную зависимость колориметрического сигнала от размера частиц авторы объясняют стерическими затруднениями при взаимодействии конъюгатов.

Вторая группа подходов для увеличения количества метки в иммунных комплексах основана на использовании частиц-носителей, включающих большое количество маркера. В иммуноанализе в качестве носителя активно применяются липосомы – сферические частицы (от десятков нанометров до сотен микрометров), состоящие из бислоя липидов (толщина около 4 нм [115]) и их производных (фосфолипиды, холестерин, фосфатидилэтаноламин и т.д.), ориентированных гидрофильными участками в сторону растворителя и содержимого липосомы [116]. Липосомы обладают большой площадью поверхности, активными функциональными группами для конъюгации с биомолекулами и большим объемом, что позволяет инкапсулировать в них маркер в высоких концентрациях. В работе Edwards и соавт. [117] показано, что одна липосома диаметром 208 ± 42 нм вмещает около $3,8 \times 10^5$ молекул флуоресцентного красителя сульфородамина В. При увеличении диаметра до 365 ± 73 нм количество инкапсулированных молекул возрастает до $2,16 \times 10^6$. Сигнал может регистрироваться как после разрушения липосомы и высвобождения маркера [118], так и для интактных частиц [119]. Shukla и соавт. [120] использовали липосомы в качестве окрашенного маркера для ИХА *Salmonella typhimurium*. ПО составил 10^2 КОЕ/мл, что превышало чувствительность коммерческих тест-систем с НЧЗ в качестве маркера на пять порядков. Charman и соавт. [121] разработали ИХА

фосфолипазы А2 с использованием липосом, содержащих биотинилированные производные полиэтиленгликоля. Фосфолипаза А2 в составе сыворотки приводит к разрушению липосом и высвобождению биотинилированных производных. Далее в реакционную смесь добавляли конъюгат НЧЗ – стрептавидин и вносили на тест-полоску со стрептавидином в тестовой зоне. Формирование тройных иммунных комплексов (стрептавидин – НЧЗ – биотинилированные производные полимера — иммобилизованный стрептавидин) приводило к окрашиванию тестовой зоны. ПО фосфолипазы А2 в сыворотке (1 нМ) был на порядок выше по сравнению с буфером.

Применение липосом для ИХА ограничено их невысокой стабильностью в присутствии компонентов матрикса. Разрушение даже небольшого числа липосом приводит к существенному повышению фонового окрашивания.

Проведенный анализ литературных данных свидетельствует о том, что НЧЗ сферической формы с диаметром около 30 нм являются наиболее широко используемым маркером в ИХА благодаря простоте синтеза и конъюгации, стабильности при хранении, а также высокой интенсивности окрашивания, позволяющей получать контрастные тестовые зоны. В качестве альтернативного маркера особый интерес представляют МЧ. МЧ позволяют концентрировать антиген из пробы и нивелировать влияния компонентов матрикса на аналитические характеристики ИХА.

Для снижения предела обнаружения особый интерес представляют подходы, основанные на восстановлении солей серебра и золота на поверхности затравочных НЧЗ на тест-полоске после проведения анализа. Такие подходы просты в исполнении и не требуют специальных навыков у пользователя. Подход, основанный на амплификации сигнала за счет агрегации частиц в потоке, также является перспективным для снижения предела обнаружения анализа.

1.4. Мультиплексные и мультипороговые форматы иммунохроматографического анализа

1.4.1. Мультиплексный иммунохроматографический анализ

Мультиплексный ИХА позволяет выявлять несколько антигенов в одной пробе в рамках одного анализа. Такой формат существенно сокращает время анализа и трудозатраты при скрининге большого количества проб [6].

В работе Dincer и соавт. [122] обобщены подходы, используемые для мультиплексного ИХА – пространственное разделение тестовых зон, разделение потока с использованием подходов микрофлюидики, применение различных меток. Подходы,

основанные на разделении потока с использованием подходов микрофлюидики [104] требуют модификации комплектации тес-систем и использования дополнительного оборудования. Пространственное разделение тестовых зон является наиболее простым в исполнении и широко используемым подходом для мультиплексного ИХА [6]. Описаны варианты мультиплексного ИХА с нанесением тестовых зон в виде пространственно-разделенных полосок [123] (рис. 7А) или точек [124] (рис. 7Б). Все остальные компоненты тест-полоски (мембрана для конъюгата, впитывающая мембрана и др.) остаются, как правило, без изменений.

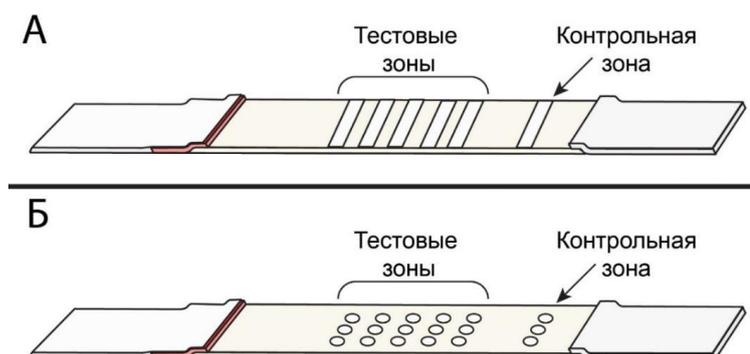


Рис. 7. Структура мультиплексных тест-полосок с различными способами нанесения иммунореагентов на мембрану: А – в виде полосок; Б – в виде точек

Точечное нанесение иммунореагентов позволяет существенно увеличить количество определяемых аналитов в рамках одного анализа. Наибольшее количество тестовых зон на одной иммунохроматографической мембране равно 5 в полосочном [125] и 384 в точечном формате [124]. Количество тестовых зон лимитируется плотностью нанесения. При нанесении большого количества зон на тест-полоску без увеличения ее размеров тестовые зоны оказываются расположены на близком расстоянии друг от друга, что затрудняет дифференциацию отдельных зон и визуальное считывание результатов. Использование тест-полосок с большими геометрическими размерами приводит к увеличению времени анализа, количества пробы и расхода комплектующих тест-систем.

В настоящее время известны мультиплексные иммунохроматографические тест-системы с точечным нанесением иммунореагентов, позволяющие определять четыре психоактивных вещества в моче [126], от пяти [127] до десяти олигонуклеотидов с разными последовательностями [128], семь вирусных и один бактериальный фитопатоген [129]. По мультиплексных тест-систем оказывается сопоставим или незначительно выше по сравнению с традиционным форматом ИХА [126, 129]. Однако благодаря возможности

определения нескольких антигенов одной тест-полоской, мультиплексные тест-системы существенно упрощают скрининг большого количества проб.

1.4.2. Мультипороговый иммунохроматографический анализ

Для бесприборного определения диапазона концентраций аналита в пробе с помощью ИХА (мультипороговый формат ИХА) предложены различные модификации, частично суммированные в работе Fu [130]. Наиболее часто используются подходы, основанные на регистрации:

- размера окрашенной тестовой зоны;
- количества окрашенных тестовых зон.

Подход, основанный на определении размера окрашенной тестовой зоны, был использован для анализа теофиллина [97], холестерина [131]. Подход, основанный на определении высоты окрашенной зоны, был использован для определения концентрационных диапазонов теофиллина в крови [132]. Для этого иммобилизовали мАт против теофиллина по всей ширине тест-полоски, а не в виде отдельных тестовых зон. При погружении тест-полоски в анализируемую пробу под действием капиллярных сил инициируется миграция пробы, что приводит к формированию иммунных комплексов. При этом, происходит конкуренция за связывание с мАт между теофиллином в пробе и внесенным конъюгатом теофиллина с пероксидазой. После добавления субстратного раствора (4-хлоро-1-нафтола) происходит формирование окрашенной области на тест-полоске. Чем выше концентрация теофиллина в пробе, тем меньшее количество меченого пероксидазой теофиллина связывается на тест-полоске. Не связавшийся конъюгат пероксидазы хрена с теофиллином мигрирует по тест-полоске. Таким образом, чем ниже концентрация теофиллина в пробе, тем выше высота окрашенной полоски. Для определения высоты окрашенной полоски авторы использовали миллиметровую бумагу. Подход, основанный на определении размера окрашенной тестовой зоны, прост в применении и позволяет достоверно определять концентрацию целевого вещества без дополнительного оборудования.

Подход, основанный на подсчете количества окрашенных тестовых линий, позволяет оценить концентрационный диапазон содержания антигена в пробе без приборного обеспечения. Данный подход был успешно использован для определения количественных диапазонов содержания липопротейна в плазме [133], неоптерина в сыворотке [134], глиаина в пищевых продуктах [135]. Как показано в работе Leung и соавт. [136], мультипороговый ИХА позволяет различать степень воспаления в зависимости от уровня С-реактивного белка. В предложенном формате на тест-полоску были нанесены четыре тестовые зоны, содержащие антитела против С-реактивного белка. Конъюгат НЧЗ с

антителами против С-реактивного белка связывался с антигеном в пробе и мигрировал по тест-полоске, последовательно проходя тестовые зоны. При прохождении через тестовую зону происходит снижение количества двойных иммунных комплексов. Чем больше концентрация антигена в пробе, тем больше количество окрашенных тестовых зон (одна окрашенная зона – концентрация С-реактивного белка составляет около 10 мг/л, две – от 10 до 25 мг/л, три – от 25 до 50 мг/л, четыре – от 50 до 100 мг/л). При концентрации менее 10 мг/л окрашенных тестовых зон не наблюдается. Предложенный формат ИХА позволяет определять степень выраженности воспаления и дифференцировать вирусные и бактериальные инфекции на основании количества окрашенных зон на тест-полоске.

1.5. Фитопатогены картофеля

В связи с отсутствием эффективных методов лечения вирусных инфекций растений, необходимо проводить контроль и не допускать зараженные клубни в посевной материал [137]. Отличительным свойством многих фитопатогенных бактерий [138] и вирусов [139] является их высокая устойчивость с сохранением инфекционной способности в неблагоприятных условиях. Поэтому даже при использовании здорового посадочного материала возможно заражение через воду и почву в процессе культивирования.

1.5.1. Фитопатогены вирусной природы

Идентифицировано около 40 фитопатогенов картофеля вирусной природы. К наиболее распространенным на территории Российской Федерации вирусным патогенам картофеля относятся вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК), X, S, M, A и Y вирусы картофеля (ХВК, СВК, МВК, АВК и YВК) (табл. 1) [140]. Поражение картофеля данными патогенами приводит к существенным экономическим убыткам из-за снижения урожайности. Отмечается снижение урожайности до 10% при заражении ХВК и МВК, до 20% для СВК, до 40% для АВК, до 80% для YВК [141]. Инфицирование картофеля вирусами приводит к ухудшению хранимости клубней и их потребительских свойств (размер, форма, содержание микро- и макроэлементов), пониженной устойчивости к засухе [137].

Табл. 1. Характеристика основных вирусных патогенов картофеля

Вирус	Систематическое положение: семейство / род [142]	Форма вируса	Размер вирусной частицы (длина / ширина), нм
ХВК [143]	<i>Alphaflexiviridae</i> / <i>Potexvirus</i>	Нитчатая	513/13

Y ^N БК [144]	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	/	Нитчатая	730/11
Y ^O БК [144]	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	/	Нитчатая	730/11
SBК [145]	<i>Betaflexiviridae</i> <i>Carlavirus</i>	/	Нитчатая	650/12
MBК [145]	<i>Betaflexiviridae</i> <i>Carlavirus</i>	/	Нитчатая	650/12
BCЛК [146]	<i>Luteoviridae</i> <i>Polerovirus</i>	/	Изометрическая	24

Распознаваемой антителами структурой вируса, как правило, является эпитоп на поверхности белка оболочки [8]. Используемые в работе вирусные частицы (вирионы) состоят из большого числа идентичных белков (например, 1130 для ХБК [143], около 1800 для MBК [145]), их можно рассматривать как поливалентные корпускулярные антигены. Структура вирусной частицы зависит от состава внешней среды. В работе Kegel и соавт. [147] показано влияние значения рН и ионной силы на дезагрегацию частиц вируса табачной мозаики (рис. 8). Варьирование состава среды приводит к изменению во вторичной, третичной и четвертичной структуре белка оболочки и формированию вирусных частиц различного состава.

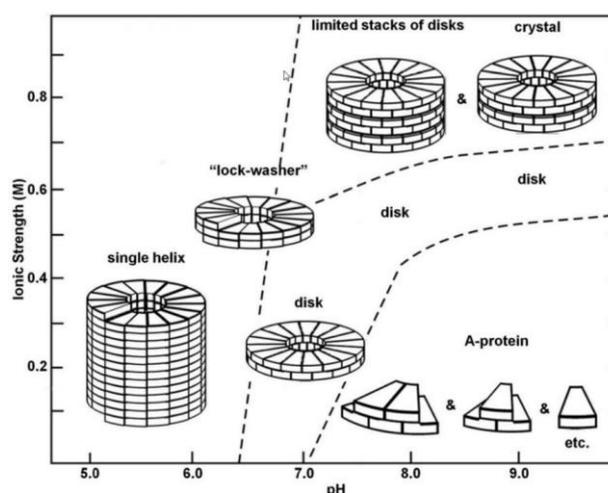


Рис. 8. Влияние рН и ионной силы буфера на структуру частиц вируса табачной мозаики [147]

Структурные превращения вириона приводят к образованию различных по составу иммунных комплексов с антителами и их конъюгатами. Такие изменения влияют на

кинетические параметры взаимодействий с иммунореагентами и, как следствие, на ПО и аналитические характеристики ИХА.

1.5.2. Фитопатогены бактериальной природы

На территории Российской Федерации к приоритетным бактериальным патогенам картофеля относятся: *Dickeya solani*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* [148,149]. Их характеристика представлена в табл. 2.

Табл. 2 Характеристика использованных в работе фитопатогенов бактериальной природы

Бактерия	Окрашивание по Граму	Статус патогена
<i>Dickeya solani</i>	Грамотрицательные	Регулируемый некарантинный вредный организм
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Грамотрицательные	Карантинный объект
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Грамположительные	Регулируемый некарантинный вредный организм
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Грамотрицательные	Регулируемый некарантинный вредный организм
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Грамотрицательные	Регулируемый некарантинный вредный организм

R. solanacearum вызывает бурую гниль картофеля и является карантинным объектом на территории РФ (включена в список А1 – карантинные объекты, отсутствующие на территории Российской Федерации). *C. michiganensis* вызывает кольцевую бурую гниль картофеля и относится к некарантинным вредным организмам на территории РФ (включена в список А3 – регулируемый некарантинный вредный организм). Согласно рекомендациям Европейско-Средиземноморской организации по защите растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization – EPPO), *R. solanacearum*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* и subsp. *sepedonicus* должны регулироваться в качестве карантинных вредных организмов.

Бактерии рода *Dickeya* (*D. solani*, *D. dianthicola*) способны поражать экономически значимые культуры (картофель, кукурузу и томаты) и вызывать гниение клубней картофеля («черная ножка»). Потери картофеля, обусловленные *Dickeya* spp., достигают 25% [150]. *R. solanacearum* способна поражать более 200 видов, включая такие экономически значимые культуры, как томаты, бананы, баклажаны и др. [151]. Потери, вызываемые бурой гнилью, достигают 100% для бананов, 90% для томатов и картофеля, 30% для табака [152]. *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* вызывают гниение клубней картофеля при выращивании и

хранении [153]. Экономический ущерб от поражения картофеля патогенами бактериальной природы включает снижение урожайности, потери при хранении и ухудшение потребительских свойств. Поэтому контроль бактериальных патогенов в растениях и посевном материале является необходимым условием высокопродуктивного сельского хозяйства.

Сложность иммунохимической диагностики бактерий связана с их структурной организацией. Большинство бактерий формируют внешнюю оболочку из различных по составу полисахаридов, выполняющих защитные функции. Именно белково-полисахаридные комплексы являются основными антигенами бактериальных клеток [154]. Структура полисахаридных антигенов может варьироваться даже в рамках одного вида [155]. Сходство строения экспонированных на поверхности клеточной стенки антигенов для разных штаммов (и даже видов) является одной из существенных проблем в иммунодиагностике бактерий. Для снижения кросс-реактивности иммуноанализа могут быть использованы моноклональные антитела (мАт) [156], но и они взаимодействуют с антигенами со сходной структурой. Например, в работе Griep и соавт. [157] установлено, что мАт против липополисахаридов клеточной стенки *R. solanacearum* связывались с *R. syzygii*, *Serratia fonticola*, *Enterobacteriaceae* spp. МАт против целых клеток *Dickeya* spp, полученные Pechham и соавт. [158], взаимодействовали с *Erwinia chrysanthemi*, *P. carotovorum*. В работе De Boer [159] показано, что мАт против компонента клеточной стенки одного штамма *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* реагировали со всеми остальными штаммами данной бактерии из-за сходства структуры полисахаридов на поверхности. Грамотрицательные бактерии в зависимости от условий культивирования способны изменять первичную структуру антигенных детерминант на поверхности клетки (как правило, полисахаридов), сокращать длину О-фрагментов липополисахаридов или даже полностью подавлять их синтез [160]. Такие изменения в структуре эпитопа приводят к снижению или даже утрате антигенсвязывающей активности моноклональных антител [161]. Поликлональные антитела (пАт) гетерогенны по составу (содержат антитела с различной специфичностью), поэтому при работе с ними изменения в структуре одного типа антигена не приведут к существенному снижению антигенсвязывающей способности. Применение пАт для ИХА фитопатогенных бактерий позволяет определять близкородственные штаммы бактерий без их дифференциации. Однако при разработке ИХА необходимо проверять кросс-реактивность иммунореагентов по отношению к близкородственным штаммам бактерий и использовать антитела с наибольшей специфичностью.

Разработка новых форматов ИХА является актуальной задачей, востребованной для практики. Актуальной задачей для мультиплексных форматов ИХА является расширение спектра контролируемых фитопатогенов и снижение ПО.

1.5.3. Диагностика фитопатогенов вирусной и бактериальной природы

На начальных этапах поражения растения накапливают низкие количества фитопатогенов и не проявляют видимых признаков заражения. Такое состояние называется латентной инфекцией [162]. В работе Rérombelon [163] установлено, что значительное число (в некоторых случаях до 80%) клубней картофеля без внешних симптомов были заражены *Erwinia (Pectobacterium) var atroseptica* и *E. carotovorum*. В дальнейшем было показано [164] низкое содержание бактерий – 10^3 – 10^5 клеток на поверхности клубня и 10-100 клеток в придаточных почках (на 3 мм^2 клубня). Использование растений с латентной инфекцией как посевного материала может привести к накоплению больших количеств фитопатогена, появлению видимых симптомов, развитию инфекции [165]. Таким образом, выявление низких концентраций фитопатогенов является актуальной задачей.

Для фитопатологии большой интерес представляют методы внелабораторного анализа (методы диагностики фитопатогенов в «полевых условиях»). Идеальный метод анализа должен отвечать следующим требованиям [18]:

- быть простым в исполнении (не требовать специальных навыков);
- не требовать дорогостоящего и стационарного оборудования;
- не требовать сложной подготовки проб;
- определять несколько фитопатогенов в пробе в рамках одного анализа;
- иметь низкий предел обнаружения;
- быть дешевым.

Известные методы определения фитопатогенов могут быть разделены на несколько основных групп.

Визуальная диагностика основана на оценке внешних симптомов у пораженного растения – неравномерность окраски листа (мозаика), некроз и деформация тканей, угнетение роста, увядание, снижение урожайности. Данный метод диагностики наименее информативен по ряду причин:

- видимые симптомы проявляются при накоплении больших количеств фитопатогенов;
- невозможность однозначного определения фитопатогена;
- невозможность определения поражения растения сразу несколькими фитопатогенами;
- длительное развитие симптомов;

- некоторые симптомы проявляются как при инфекциях, так и при неблагоприятных условиях выращивания, недостатке питательных веществ и др.

К группе методов визуальной диагностики также можно отнести использование растений-индикаторов. При заражении растения-индикаторы реагируют выраженными симптомами (например, для ХВК используют дурман *Datura stramonium*). Растения-индикаторы инокулируют соком исследуемого растения, после чего выращивают в теплицах и наблюдают за развитием симптомов [141, 162]. Такой метод требует много времени и специальных условий культивирования, поэтому не пригоден для оперативного высокочувствительного определения фитопатогенов.

Методы визуализации патогенов, прежде всего – электронная микроскопия экстрактов растений [166]. На основании морфологии вирусных частиц возможно сделать вывод о типе вируса. Однако данный подход имеет ряд ограничений – необходимость использования дорогостоящего оборудования и реагентов, определение только высоких концентраций вируса в пробе, а в ряде случаев и невозможность однозначной идентификации патогена. Данный метод сложен в исполнении, требует специальных навыков и занимает много времени.

Для выявления фитопатогенов бактериальной природы могут быть использованы микробиологические методы выделения и обогащения культуры [167]. Однако такой подход также предъявляет повышенные требования к оборудованию и персоналу, чистоте помещений и расходных материалов.

Для высокочувствительной диагностики фитопатогенов вирусной и бактериальной природы наибольшее распространение получили молекулярно-генетические (основаны на определении специфической последовательности нуклеиновой кислоты фитопатогена) и серологические (основаны на взаимодействии высокоспецифичных антител с фитопатогенами) методы анализа [168]. Молекулярно-генетические методы анализа не отличаются по требованиям от микробиологических и поэтому малоприспособлены для оперативного анализа и рутинного скрининга большого количества проб во внелабораторных условиях.

Предложено большое число вариантов иммуноанализа патогенов картофеля вирусной и бактериальной природы [18, 168]. В связи с высокой экономической важностью имеется ряд коммерчески доступных иммунохроматографических и иммуноферментных тест-систем (Bioreba, Agdia, Loewe и т.д.). Также имеется несколько разработок мультиплексного иммуноанализа фитопатогенов – с использованием люминесцентных частиц [169, 170] и меченных флуоресцентным красителем антител [171]. Предел обнаружения ИХА фитопатогенов, как правило, составляет ≥ 2 нг/мл для вирусов [172] и

10^5 клеток/см³ для бактерий [173]. Описана единственная иммунохроматографическая тест-система для одновременного определения восьми патогенов картофеля в пробе [129]. Пределы обнаружения ХВК (1 нг/мл), Y^OВК (1 нг/мл), Y^NВК (40 нг/мл), МВК (10 нг/мл), ВСЛК (20 нг/мл), СВК (100 нг/мл), АВК (300 нг/мл), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (10^4 клеток/мл) сопоставимы с ИФА. Увеличение количества определяемых фитопатогенов (особый интерес представляют *Dickeya solani*, *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* и карантинная бактерия *R. solanacearum*), а также дальнейшее снижение предела обнаружения анализа являются актуальными задачами для практической фитопатологии. Такие тест-системы могут быть использованы как средства первичного фитосанитарного скринингового контроля.

Проведенный анализ литературы позволяет заключить, что иммунохроматографический анализ является востребованным методом в практической фитопатологии. Иммунохроматографические тест-системы позволяют проводить определение фитопатогенов за короткий промежуток времени, без использования дорогостоящего стационарного оборудования и сложной подготовки проб как в лабораторных, так и в полевых условиях. Однако высокий предел обнаружения и низкая информативность ограничивают возможности метода. Поэтому актуальна разработка новых подходов для снижения предела обнаружения фитопатогенов. Предлагаемые решения не должны нивелировать основные достоинства анализа – увеличивать его продолжительность, существенно усложнять условия проведения. Разработка новых форматов ИХА для мультиплексного и бесприборного определения количественного диапазона содержания фитопатогенов является актуальной задачей.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы и оборудование

В работе использовали фитопатогены картофеля вирусной (X, Y^N (некротический штамм) и Y^O (обыкновенный штамм), S, M, A вирусы картофеля, вирус скручивания листьев картофеля) и бактериальной (*Ralstonia solanacearum*, *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum*) природы. Депонированные коллекционные образцы вирусов и бактерии, а также зараженные и здоровые листья и клубня картофеля были любезно предоставлены к.б.н. Ю.А. Варицевым (ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, Московская обл., п. Красково) и к.б.н. Н.В. Дреновой (Всероссийский центр карантина растений, Московская обл., п. Быково). Поликлональные антитела, специфичные к ХВК, Y^OВК, СВК, МВК, АВК, ВСЛК, *R. solanacearum*, *C. michiganensis*, были предоставлены Ю.А. Варицевым. ПАТ против *D. solani*, *D. dianthicola*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, Y^NВК были получены в данной работе. МАт (клоны 1А5 и 3G4) против ХВК были получены ранее совместно с к.б.н. В.Г. Авдиенко (ЦНИИ туберкулеза) [174]. В работе использованы антитела козы против иммуноглобулинов кролика («Имтек», Россия и «Arista Biologicals», США), антитела козы против иммуноглобулинов мыши («Arista Biologicals», США), конъюгаты пероксидазы с козьими антителами против иммуноглобулинов кролика и мыши («Медгамал», Россия), конъюгат щелочной фосфатазы с козьими антителами против иммуноглобулинов мыши, полный и неполный адьювант Фрейнда («MP Biomedicals», США). 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, нитросиний тетразолий хлорид (NBT), 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), золотохлористоводородная кислота («Fluka», Германия), магнитные частицы оксида железа с полистироловым покрытием и карбоксильными группами («Magsphere», США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты N-гидроксисукцинимид («ThermoFisher», США), 2-аминоэтанол гидрохлорид, бычий сывороточный альбумин (BSA), азид натрия, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, додецилсульфат натрия, п-нитрофенил фосфат, пероксидаза из корней хрена («Sigma Aldrich», США), карбонат натрия, гидрокарбонат натрия, сульфат аммония, дигидрофосфат калия, гидроксид калия, тетраборат натрия, лимонная кислота, цитрат натрия, этиловый спирт, пероксид водорода, хлорид натрия, карбонат калия («Химмед», Россия). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду, полученную с помощью установки MilliQ («Millipore», США). Все реагенты были аналитической или химической чистоты.

Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали мембраны производства «Advanced Microdevices» (Индия) (рабочие нитроцеллюлозные мембраны CNPF-8μ, CNPF-10μ, CNPC-10μ, CNPC-12μ, CNPC-15μ, CNPH-90, CNPH-200; стекловолоконную мембрану для нанесения конъюгата PT-R5, мембраны для нанесения образца GFB-R4, конечную адсорбирующую мембрану AP045) и «Millipore» (США) (рабочие нитроцеллюлозные мембраны Millipore Hi-Flow Plus 75, 90, 135, 180).

Нанесение тестовых и контрольных зон на нитроцеллюлозные мембраны в виде линий проводили с помощью диспенсера IsoFlow («Imagene Technology», США), в точечном формате – с помощью диспенсера BioDot AD1520 («BioDot», Великобритания). Мембраны нарезали с использованием автоматического резака Index Cutter-1 (A-Point Technologies, США).

Для проведения ИФА использовали 96-луночные прозрачные полистироловые микропланшеты Costar 9018 («Corning Costar», США). Промывку лунок микропланшета проводили с помощью автоматического моющего устройства Biochrom Anthos Fluido 2 («Biochrom», Великобритания). Оптическую плотность растворов определяли с помощью спектрофотометра Biochrom Libra S80 («Biochrom», Великобритания) с использованием кварцевых кювет («Hellma Analytics», Германия) с различной длиной оптического пути (1, 2, 5, 10 мм), а также многофункционального планшетного анализатора EnSpire multimode plate reader («Perkin Elmer», США).

Для проведения атомно-силовой микроскопии (АСМ) использовали микроскоп Aist SPM-1000, кантилеверы fpN01HR (длина балки 130 ± 5 мкм, резонансная частота на воздухе ≈ 160 кГц, жесткость балки ≈ 5 Н/м, радиус кривизны 1 нм), слюду (все - «Aist-NT», Россия).

Размеры частиц характеризовали с помощью лазерного анализатора наночастиц Zetasizer Nano ZSP («Malvern Instruments», Великобритания), просвечивающего электронного микроскопа JEM CX-100 («Jeol», Япония) и сканирующего электронного микроскопа Tescan MIRA 3 LMU («Tescan», Чехия).

Для изучения агрегативной устойчивости наночастиц использовали установку для фракционирования в поле поперечных сил Wyatt Eclipse 3+ («Wyatt Technology», Германия) с оптическим детектором («Agilent Technologies», США), детектором светорассеяния Dawn HELEOS II и рефрактометром Optilab T-Rex («Wyatt Technology», США). Для проведения капиллярного электрофореза использовали установку P/ACE MDQ Beckman Coulter («Beckman», США).

Для отделения белковых молекул и их конъюгатов от низкомолекулярных соединений использовали диализные мешки (D9277-100FT, «Sigma-Aldrich», США).

2.2. Методы

2.2.1. Характеристика вирусных и бактериальных фитопатогенов методом атомно-силовой микроскопии

Вирусные препараты в 50 мМ фосфатном буфере с 100 мМ хлорида натрия, pH=7,4 (фосфатный буфер солевой – ФБС) в концентрации 5 мкг/мл наносили на свежесколотую поверхность слюды и выдерживали в течение 10 минут. Бактерии (*D. solani* и *R. solanacearum*) растворяли в ФБС до концентрации 10^8 кл./мл и сорбировали в таком же режиме. Избыток жидкости с поверхности слюды удаляли фильтровальной бумагой. Сканирование проводили в полуконтактном режиме. Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения AIST («АИСТ-НТ», Россия) и «Gwiddion» (Czech Metrology Institute, Чехия) [175].

2.2.2. Получение поликлональных антител против фитопатогенов вирусной и бактериальной природы

Сыворотки к *D. solani*, *D. dianthicola*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *C. michiganensis* и Y^{НВК} были получены путем иммунизации самок кроликов породы «Советская шиншилла» в возрасте от 3 месяцев. В работе были использованы два штамма *P. atrosepticum* и *D. dianthicola*. Бактерии (10^9 кл./мл) смешивали с неполным адьювантом Фрейнда, вирусы (500 мкг/мл) с полным адьювантом Фрейнда. Иммунизацию суспензией бактерий (1 мл) проводили внутримышечно в заднюю лапу с промежутком в неделю [176], иммунизацию вирусной суспензией (1 мл) – подкожно с промежутком в неделю. После четырех инъекций отбирали кровь кроликов. Проводили три отбора крови с интервалом в одну неделю. Для отделения сыворотки кровь выдерживали в течение 24 часов при 37°C. Сыворотку центрифугировали в течение 15 минут при 5000 g, 4°C. Для выделения IgG к сыворотке добавляли равный объем насыщенного сульфата аммония и перемешивали в течение 24 часов при 4°C. IgG осаждали центрифугированием 14000 g в течение 15 минут при 4°C, перерастворяли в ФБС и диализовали против ФБС [156]. Полученный препарат хранили при 4°C с добавлением 0,05% азида натрия.

2.2.3. Определение титра сывороток

Титры полученных сывороток определяли методом иммуноферментного анализа [177]. Антигены (*D. solani*, *D. dianthicola*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *C. michiganensis*; 10^8 кл./мл в ФБС; Y^{НВК} – 1 мкг/мл в ФБС) сорбировали на поверхность лунок полистиролового микропланшета в течение 2 часов при 37°C. В качестве отрицательного контроля для бактерий сорбировали неспецифичные бактерии (*D. solani*, *D. dianthicola*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *C. michiganensis*) (10^8 кл./мл в ФБС), для Y^{НВК} - вирус табачной мозаики (1 мкг/мл в ФБС). Несвязавшиеся реагенты удаляли трехкратной

промывкой лунок ФБС с добавлением 0,05% Тритон X-100 (ФБС-Т) После отмывки в лунки вносили сыворотки с разбавлением от 10^3 до 10^8 в ФБС-Т и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Микропланшет трижды отмывали ФБС-Т, после чего добавляли конъюгат пероксидазы с козьими антителами против иммуноглобулинов кролика (разведение коммерческого препарата 1:3000) в ФБС-Т и выдерживали в течение 1 часа при 37°C. После отмывки в лунки планшета вносили 100 мкл субстратной смеси – 0,4 мМ ТМБ в 40 мМ цитратном буфере, рН=4,0, 3 мМ H_2O_2 – и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (A_{450}). Титром сыворотки считали значение разбавления, равное сумме среднего значения A_{450} и трех стандартных отклонений для реакции сыворотки с отрицательным контролем.

2.2.4. Биотинилирование антител

Для биотинилирования антитела смешивали с N-гидроксисукцинимидом биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты в мольном соотношении 1:15 и инкубировали в течение 60 минут при 25°C. Биотинилированные антитела диализовали против ФБС и хранили при 4°C с добавлением 0,05% азида натрия.

2.2.5. Получение Fab-фрагментов антител

Для получения Fab-фрагментов использовали мАт клона 3G4 к ХВК. Получение Fab-фрагментов IgG основано на ферментативном гидролизе молекул антител и очистке с применением метода аффинной хроматографии [156]. В работе использовали коммерческий набор «Pierce Fab preparation kit» («ThermoFisher», США). Антитела (2 мг/мл) инкубировали с иммобилизованным на агарозе папаином при +37°C в течение 2 часов, полученный гидролизат центрифугировали в течение 2 минут при 5000 g. Супернатант смешивали с белком А, иммобилизованным на сефарозе, и инкубировали в течение 20 минут при 25°C при постоянном перемешивании. Далее отделяли гидролизованные антитела от иммобилизованного белка А на спин-колонках путем центрифугирования (1000 g в течение 2 минут при 4°C). Концентрацию белка в полученном препарате Fab фрагментов определяли спектрофотометрически при 280 нм (коэффициент экстинкции $1,4 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

2.2.6. Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили с использованием камер Bio-Rad Mini-Protean 3 cell («Bio-Rad», США). Использовали два полиакриламидных геля (ПААГ) – разрешающий и концентрирующий. Разрешающий ПААГ (конечное содержание полиакриламида – 12,5%) получали смешиванием 30% акриламида (6,24 мл), дистиллированной воды (2,83 мл), 0,5 М Трис-НСl (рН=8,8, 5,63 мл) и 10% додецилсульфата натрия (10%, 150 мкл).

Полимеризацию разрешающего ПААГ инициировали добавлением персульфата аммония (10%, 150 мкл) и тетраметилэтилендиамина (12 мкл). Концентрирующий ПААГ (5%) получали смешиванием 30% акриламида (1,15 мл), дистиллированной воды (4,76 мл), Трис-НСl (рН=6,8, 880 мкл), и 10% додецилсульфата натрия (70 мкл), инициируя полимеризацию добавлением персульфата аммония (10%, 70 мкл) и тетраметилэтилендиамина (7 мкл). Электродный буфер с рН=8,3 имел следующий состав: 30,3 г трис-(оксиметил)-аминометана, 144 г глицина, 10 г додецилсульфата натрия, дистиллированная вода до объема 1 л. Пробы разбавляли буфером, полученным при смешивании 3,55 мл дистиллированной воды, 1,25 мл 0,5 М Трис-НСl (рН=6,8), 2,5 мл глицерина, 2 мл 10% додецилсульфата натрия, 0,2 мл 0,5% бромфенолового синего и 5% 2-меркаптоэтанола, до конечной концентрации белка в пробе 100 мкг/мл, нагревали в твердотельном термостате до 100°C и выдерживали в течение 5 минут. После охлаждения 10 мкл пробы вносили в лунки верхнего концентрирующего геля. Приложенное напряжение – 30-40 В до входа и 130 В при входе в разделяющий гель. Источник маркеров молекулярной массы – набор Protein prestained ladder («ThermoFisher», США). Для окрашивания гели помещали в раствор, содержащий 0,4% кумасси синий R-250, 10% уксусной кислоты и 40% этанола, и доводили до кипения. Инкубировали в течение 20 минут. Отмывку гелей проводили 7% раствором уксусной кислоты в течение 16-18 часов [178]. Изображение окрашенных зон в цифровом формате получали путем сканирования гелей.

2.2.7. Иммуноферментный анализ

ИФА фитопатогенов проводили в «сэндвич» формате, используя несколько схем, описанных ниже.

2.2.7.1. Иммуноферментный анализ с антивидовыми антителами

Антитела (кроличьи пАт) (1 мкг/мл в ФБС) сорбировали в течение двух часов в лунках микропланшета из объема 100 мкл при 37°C. Микропланшет пятикратно отмывали ФБС-Т с использованием автоматического моющего устройства Biochrom Anthos Fluido. Добавляли анализируемую пробу в ФБС-Т и инкубировали 60 минут при 37°, после чего проводили отмывку ФБС-Т. В лунки микропланшета добавляли специфичные к антигену антитела (мышинные мАт) (1 мкг/мл в ФБС-Т) и инкубировали 60 минут при 37°. Проводили отмывку ФБС-Т. Добавляли 100 мкл конъюгата антивидовых (пАт козы против IgG мыши) антител с пероксидазой хрена (1:3000 в ФБС-Т), инкубировали 60 минут при 37°C. Проводили отмывку ФБС-Т. Далее добавляли субстратный раствор ТМБ, как описано в разделе 2.2.3.

2.2.7.2. Иммуноферментный анализ с биотинилированными антителами

Стадии сорбции антител на поверхность лунок микропланшета и добавления анализируемой пробы совпадали с 2.2.7.1. Далее в лунки микропланшета добавляли специфичные биотинилированные антитела (1 мкг/мл в ФБС-Т) и инкубировали 60 минут при 37°. Проводили отмывку ФБС-Т. Добавляли 100 мкл конъюгата стрептавидин-полипероксидаза (1:6000 в ФБС-Т). Инкубировали 60 минут при 37°C. Проводили отмывку ФБС-Т и добавляли 100 мкл субстратного раствора ТМБ, как описано в разделе 2.2.3.

2.2.7.3. Иммуноферментный анализ с щелочной фосфатазой

Стадии сорбции антител на поверхность лунок микропланшета, добавления анализируемой пробы и специфичных к антигену антител совпадали с 2.2.7.1. Далее добавляли 100 мкл конъюгата антивидовых антител со щелочной фосфатазой (1:4000 в ФБС-Т). Инкубировали 60 минут при 37°C. Проводили отмывку ФБС-Т. Добавляли 100 мкл субстратного раствора, содержащего 1 мг/мл п-нитрофенил фосфата в 1 М диэтаноламинном буфере с 0,5 М хлоридом магния, рН = 9,8, и инкубировали 90 минут при комнатной температуре. Для остановки реакции добавляли 50 мкл 3 М гидроксида натрия.

Для трех описанных выше схем измерение интенсивности окраски субстратного раствора после остановки ферментативной реакции проводили на 96-луночном спектрофотометре PerkinElmer. Регистрировали оптическую плотность продуктов ферментативной реакции при длине волны 450 нм (A_{450}) для пероксидазы и 405 нм (A_{405}) для щелочной фосфатазы. Зависимости оптической плотности от концентрации антигена строили с помощью программы OriginPro 9.0 (Origin Lab, США). По анализу определяли как концентрацию антигена, которая соответствует величине оптической плотности, равной сумме среднего значения сигнала и трех стандартных отклонений отрицательной пробы.

2.2.8. Специфичность антител

Специфичность мАт и пАт к ХВК исследовали методом ИФА (вариант с биотинилированными антителами). На второй стадии добавляли различные вирусы – ХВК, Y^OВК, Y^NВК, СВК, МВК, АВК, ВСЛК.

Специфичность антител (процент кросс-реактивности) рассчитывали, как отношение пределов обнаружения ХВК и неспецифичных вирусов:

$$\text{Кросс – реактивность} = \left(\frac{\text{ПО}_{\text{ХВК}}}{\text{ПО}_{\text{другие вирусы}}} \right) * 100\%$$

2.2.9. Изучение кинетических параметров взаимодействия методом поверхностного плазмонного резонанса

Измерение констант иммунохимических реакций методом поверхностного плазмонного резонанса проводили на приборе Biacore X («GE Healthcare», США). Для

иммобилизации антител использовали чип CM3 («GE Healthcare», США). Для определения оптимального значения pH МАт клон 3G4 против ХВК в концентрации 50 мкг/мл в разных буферах (pH от 4 до 5.5) вводили в систему и измеряли величину отклика сенсора. Значение pH, обеспечивающее наибольший отклик сенсора, использовали для ковалентной иммобилизации антител карбодиимидным методом. Карбоксильные группы на поверхности чипа активировали смесью (1:1) 0,4 М EDC и 0,1 М NHS в течение 7 минут (скорость потока 10 мкл/мин, объем активаторов 70 мкл). Далее пропускали антитела (70 мкл) в выбранном буфере и концентрации 50 мкг/мл. Непрореагировавшие активированные карбоксильные группы на поверхности чипа блокировали 1 М этаноламином, pH=8,5 (70 мкл) при скорости потока 10 мкл/мин.

Все последующие стадии эксперимента проводили в HEPES буфере с добавлением 150 мМ хлорида натрия и 0,005% Твин-20. Вводили ХВК (5 мкг/мл, 10 мкл) и регистрировали увеличение сигнала сенсора, свидетельствующее о формировании комплексов ХВК – иммобилизованные на чипе антитела. Далее в систему вводили препараты исследуемых антител/Fab фрагментов в различных концентрациях (1000 – 16 нМ). Регенерацию поверхности чипа осуществляли путем промывки канала 10 мМ глициновым буфером (pH = 2,0) [174]. Все измерения проводили в дифференциальном режиме, сравнивая результаты с контрольной ячейкой, не содержащей иммобилизованных антител.

Обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения ViaCore и ViaEvaluation («Biacore», Швеция).

2.2.10. Характеристика иммунных комплексов методом капиллярного электрофореза

Капиллярный электрофорез проводили с использованием установки P/ACE MDQ («Beckman», США) с кварцевыми капиллярами (внутренний диаметр 75 мкм, наружный диаметр 360 мкм, длина от места введения реагентов до детектора 70 см) производства «Molex» (США), регистрируя величину поглощения при 280 нм. Все эксперименты проводили в 50 мМ Трис буфере, pH = 7,5. Для формирования иммунных комплексов смешивали равные объемы ХВК (700 мкг/мл) и МАт клон 3G4 (3-1600 мкг/мл) или Fab фрагментов (6-160 мкг/мл) и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Капилляр термостатировали при 25°C. Полученные распределения оптической плотности по длине капилляра обрабатывали с помощью программного обеспечения 32 Karat («Beckman», США).

2.2.11 Характеристика иммунных комплексов методом атомно-силовой микроскопии

Для формирования иммунных комплексов мАТ клона 3G4 и Fab фрагменты 3G4 (от 3 до 210 мкг/мл в ФБС) смешивали с ХВК (5 мкг/мл в ФБС) и инкубировали в течение 20 минут. Полученные препараты наносили на поверхность свежесколотой слюды и сорбировали в течение 10 минут. Сканирование образцов и обработку результатов проводили, как описано в разделе 2.2.1.

2.2.12. Синтез наночастиц золота

НЧЗ получали восстановлением ЗХВК цитратом натрия (метод Френса) [179]. К предварительно профильтрованной (фильтр 0,22 мкм) деионизованной воде (190 мл) добавляли 2 мл 1% раствора ЗХВК и доводили до кипения. Затем добавляли 8 мл 1% цитрата натрия, кипятили раствор 35 минут при интенсивном перемешивании с использованием обратного холодильника. Препарат НЧЗ хранили при 4–6°C.

Для формирования наращенных частиц использовали метод, основанный на восстановлении ЗХВК в присутствии пероксида водорода (усиливающий раствор). НЧЗ, синтезированные по методу Френса, использовали в качестве затравочных частиц. Увеличение размера НЧЗ исследовали при различном составе усиливающего раствора – концентрация пероксида водорода (3,07; 1,86; 0,59; 0,31 М; 63; 12; 0,12 мМ), рН среды (3,0; 4,0; 5,0; 6,0). Для приготовления усиливающего раствора смешивали равные объемы 2,5 мМ ЗХВК и пероксида водорода в выбранной концентрации. Усиливающий раствор готовили непосредственно перед использованием. Коллоидный раствор затравочных НЧЗ (100 мкл) смешивали с различными объемами (1-150 мкл) усиливающего раствора. Коллоидный раствор наращенных НЧЗ исследовали методами спектрофотометрии (от 400 до 700 нм), динамического лазерного светорассеяния (ДЛСР) (раздел 2.2.15) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (раздел 2.2.17).

2.2.13. Синтез и характеристика конъюгатов наночастиц золота с биомолекулами

Для синтеза конъюгатов использовали физическую адсорбцию биомолекул на поверхность НЧЗ. Предварительно определяли минимальную стабилизирующую концентрацию с помощью флокуляционной кривой. Антитела и их конъюгаты с щелочной фосфатазой диализовали против 10 мМ Трис, рН=9,0. Стрептавидин и белок А диализовали против 10 мМ ФБС, рН = 6,5. Для построения флокуляционной кривой к 200 мкл НЧЗ добавляли иммобилизуемые биомолекулы до концентрации от 0 до 18 мкг/мл и выдерживали в течение 10 минут. Далее добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 1% и измеряли оптическую плотность при 580 нм [172].

В различных экспериментах для конъюгации использовали концентрацию белка, равную или превышающую на 10-60% точку выхода флокуляционной кривой на плато. Смешивали препарат НЧЗ ($A_{520} = 1$) с раствором биомолекул в выбранной концентрации и выдерживали в течение 60 минут при постоянном перемешивании. Далее добавляли БСА до конечной концентрации 0,25% и инкубировали 15 минут. Конъюгат НЧЗ отделяли от свободных молекул с помощью центрифугирования (18000 g, 4°C, 30 минут) и ресуспендировали в 20 mM Трис-буфере, pH=7,5, содержащем 1% БСА, 1% сахарозы, 0,1% азида натрия и 0,25% Твин-20 (тТБСА). Для характеристики полученных растворов измеряли их оптическую плотность при длине волны 520 нм (A_{520}). В результате были получены конъюгаты НЧЗ с пАт и мАт и их биотинилированными производными против фитопатогенов вирусной и бактериальной природы, стрептавидином, конъюгатом щелочной фосфатазы с антивидовыми антителами, белком А.

Помимо этого, был синтезирован конъюгат НЧЗ, содержащий пять антител разной специфичности (универсальный конъюгат). Для синтеза универсального конъюгата смешивали растворы НЧЗ ($A_{520} = 1$) и антител, специфичных к Х-, М-, S-, УВК и ВСЛК. Конечная концентрация для каждого антитела составляла 10 мкг на 1 мл раствора НЧЗ. Полученную смесь выдерживали в течение 60 минут при постоянном перемешивании. Далее добавляли БСА до конечной концентрации 0,25% и инкубировали 15 минут. Конъюгат НЧЗ отделяли от свободных молекул с помощью центрифугирования (18000 g, 30 минут) и ресуспендировали в тТБСА.

2.2.14. Синтез конъюгатов магнитных частиц с антителами

Карбоксилированные МЧ (80 мкл, $2,15 \times 10^{11}$ частиц/мл) ресуспендировали в водном растворе, содержащем EDC (40 mM) и NHS (20 mM), и инкубировали в течение 30 минут при 25°C и постоянном перемешивании. Далее МЧ концентрировали при помощи магнита, удаляли активаторы вместе с супернатантом и трехкратно промывали ФБС также при помощи магнитного концентрирования. После отмывки к активированным МЧ добавляли различные количества (0,4; 4; 20; 32; 40; 120; 200 мкг) мАт клона 3G4 в ФБС и выдерживали 2 часа при 25°C и постоянном перемешивании. Конъюгат МЧ концентрировали, супернатант, содержащий несвязавшиеся антитела, отделяли, а МЧ промывали, как описано выше. Для блокирования непрореагировавших активированных карбоксильных групп добавляли этаноламин до конечной концентрации 50 mM и выдерживали 30 минут. Конъюгат МЧ отмывали, как описано выше, ресуспендировали в тТБСА и хранили при 4°C.

Процент конъюгированных с МЧ антител определяли по разности между количествами добавленных к МЧ и не связавшихся (отделенных в супернатанте) антител. Количество антител в супернатанте определяли с использованием набора Micro BCA

Protein Assay Kit assay («ThermoFisher», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для калибровки использовали раствор БСА с известной концентрацией.

2.2.15. Определение размера частиц методом динамического лазерного светорассеяния

Для определения размера частиц использовали анализатор наночастиц Zetasizer Nano ZSP («Malvern Instruments», Великобритания) и одноразовые акриловые кюветы. Измерения проводили при температуре 25°C, рассеяние света регистрировали при 173°. Проводили не менее 80 измерений, результаты статистически обрабатывали с использованием программного обеспечения Malvern software ver. 7.11 («Malvern Instruments», Великобритания).

2.2.16. Измерение дзета-потенциала частиц методом электрофоретического рассеяния света

Для определения дзета-потенциала (ξ – потенциал) использовали анализатор наночастиц Zetasizer Nano ZSP и одноразовые кюветы с электродами. Разбавление препаратов проводили деионизированной водой. Измерения проводили при температуре 25°C, рассеяние света регистрировали при 173°. Проводили не менее 50 измерений, результаты статистически обрабатывали с использованием программного обеспечения Malvern software ver. 7.11.

2.2.17. Определение размера частиц методом просвечивающей электронной микроскопии

Для характеристики размера и морфологии иммунных комплексов, НЧЗ, МЧ и их конъюгатов использовали просвечивающий электронный микроскоп JEM CX-100 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. На медные сетки с покрытием из поливинилформаль наносили 10 мкл пробы и выдерживали в течение 10 минут. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Для визуализации иммунных комплексов, содержащих ХВК, использовали негативное контрастирование [166]. Для негативного контрастирования на сетки после высушивания пробы наносили 10 мкл 2%-ной фосфорновольфрамовой кислоты и выдерживали в течение 30 секунд, промывали деионизированной водой и высушивали фильтровальной бумагой. Фотографии в цифровом формате анализировали с помощью программного обеспечения Image Tool («UTHSCSA», США).

2.2.18. Характеристика частиц методом фракционирования в поле поперечных сил

Для фракционирования в поле поперечных сил НЧЗ и их конъюгатов с антителами использовали систему Wyatt Eclipse 3+ с целлюлозной мембраной («Microdyn-Nadir»,

Германия), порог отсечения 5 кДа, длина 275 мм, ширина 350 мкм. Препараты ($A_{520} = 10$) вносили в систему со скоростью основного потока 0,2 мл/мин, фокусирование проводили с постоянной скоростью основного потока (1 мл/мин) и уменьшаемой скоростью поперечного потока (от 1,6 до 0,4 мл/мин в течение 5 минут и далее 0,4 мл/мин в течение 10 минут). Анализ проводили в ФБС с добавлением 0,005% Твин-20. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения ChemStation v.B.04.03 («Agilent Technologies», США) и Astra v.6.1.1.17 («Wyatt Technology», Германия).

2.2.19. Сканирующая электронная микроскопия

Для визуализации частиц на нитроцеллюлозных мембранах после ИХА использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) MIRA 3 LMU («Tescan», Чехия). Мембраны после проведения ИХА в ФБС-Т отмывали дистиллированной водой, высушивали и напыляли на них золото с использованием Q150T ES coater («Quorum Technologies», Великобритания).

2.2.20. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии был использован для выяснения химической природы частиц, визуализированных на мембране методом СЭМ (раздел 2.2.19). Для удаления ЗХВК тест-полоску многократно промывали деионизированной водой. Использовали сканирующий электронный микроскоп MIRA 3 LMU, оснащенный энергодисперсионным рентгеновским спектрометром Aztec Energy («Oxford Instruments», Великобритания). Мембраны после ИХА в ФБС-Т отмывали дистиллированной водой, высушивали и напыляли на них углерод с использованием Q150T ES coater. В качестве внутренних стандартов использовали SiO_2 (стандарт кислорода), NaCl (стандарт натрия), KBr (стандарт калия), BN (стандарт азота), Al_2O_3 (стандарт алюминия), Au (стандарт золота). Результаты измерений сравнивали со стандартами и с базой данных и анализировали с использованием программного обеспечения Aztec Energy Energy («Oxford Instruments», Великобритания). Эксперименты по СЭМ и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии проведены совместно с Ю.В. Малаховой (ООО «ТЕСКАН»).

2.2.21. Изготовление иммунохроматографических тест-полосок

Антитела растворяли в ФБС с добавлением 5% глицерина. Иммунореагенты наносили на нитроцеллюлозные мембраны с использованием автоматического диспенсера IsoFlow («Imagene Technology», США). Концентрацию антител, наносимых в тестовой зоне, варьировали от 0,1 до 1,5 мг/мл. В контрольную зону наносили антивидовые антитела или белок А в концентрации от 0,5 до 1,0 мг/мл. Для нанесения реагентов на мембрану скорость движения диспенсера устанавливали равной 4 мм/с. Реагенты наносили с расходом 0,15 мкл/мм. Препарат НЧЗ – Ат наносили на стекловолоконную мембрану (ширина 5 мм) с

объемом 1,6 мкл/мм. Мембраны сушили при 37°C не менее 6 часов, после чего собирали мультимембранный композит, состоящий из впитывающей мембраны для образца (GFB-R4), мембраны с конъюгатом, нитроцеллюлозной мембраны, впитывающей мембраны (AP045). Для получения иммунохроматографических тест-полосок (ширина 3 мм) мультимембранный композит нарезали с использованием автоматической гильотины Index Cutter-1 («A-Point Technologies», США). Тест-полоски упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги, содержащие силикагель.

2.2.22. Приготовление экстрактов листьев и клубней картофеля

Для приготовления экстрактов использовали зараженные и здоровые клубни и листья картофеля. Фрагмент клубня/листа предварительно взвешивали, после чего помещали в фарфоровую ступку и тщательно гомогенизировали в ФБС-Т (соотношение растительная проба: ФБС-Т – 1:10). Полученные экстракты хранили при 4°C и использовали для анализа без дополнительной очистки.

2.2.23. Проведение иммунохроматографического анализа

ИХА проводили в буфере (ФБС-Т) и экстрактах листьев и клубней картофеля. Тест-полоску вертикально погружали в анализируемую пробу (100 мкл) и выдерживали в течение 10 минут. Для проведения количественного анализа тест-полоски сканировали с помощью сканера Cannon 9000F Mark II, цифровые изображения анализировали с использованием программного обеспечения TotalLab TL120 («Nonlinear Dynamics», Великобритания). Для построения калибровочных кривых (зависимость интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне от концентрации антигена в пробе) применяли программное обеспечение Origin Pro 9.0.

2.2.24. Иммунохроматографический анализ, основанный на агрегации маркера

Конъюгат МЧ с биотинилированными антителами к ХВК (раздел 2.2.14) (20 мкл) смешивали с анализируемой пробой (1000 мкл) и инкубировали 25 минут при 25°C и постоянном перемешивании. Далее с помощью магнита концентрировали МЧ и ресуспендировали в 100 мкл ФБС-Т, содержащем конъюгат НЧЗ со стрептавидином (раздел 2.2.13) (A_{520} варьировали – 0,1; 0,3; 0,5; 1). ИХА и обработку результатов проводили, как описано в разделе 2.2.23.

2.2.25. Иммунохроматографический анализ, основанный на каталитических свойствах маркера

Конъюгаты НЧЗ с мАт 3G4 и комплексом ЩФ с антивидовыми антителами (антитела козы против IgG мыши) были синтезированы, как описано в разделе 2.2.13. Для сборки тест-полосок использовали две отдельные стекловолоконные мембраны для конъюгата – на первую сорбировали конъюгат НЧЗ – анти-мАт–ЩФ (A_{520} варьировали от

0,2 до 2,0), на вторую – конъюгат НЧЗ с мАт 3G4 ($A_{520}=4$). В тестовую зону нитроцеллюлозной мембраны Millipore-75 наносили пАт к ХВК в ФБС в концентрации 1 мг/мл с БСА в концентрации 0,5 мг/мл. В контрольную зону наносили белок А в ФБС в концентрации 0,5 мг/мл.

ИХА проводили в 50 мМ Трис-буфере, рН = 8,0, содержащем 100 мМ NaCl и 0,05% Тритон X-100, как описано в разделе 2.2.23. Для ферментативной амплификации после окончания ИХА на тест-полоску наносили 10 мкл субстратного раствора. В работе использовали два вида субстрата ЩФ – п-нитрофенил-фосфат (2 мг/мл в 100 мМ натрий-карбонатном буфере, рН=9,8) и NBT (0,30 мг/мл) с ВСIP (0,15 мг/мл) в 100 мМ Трис-HCl, 5 мМ MgCl₂, рН=9,5. Для выбора времени инкубации с субстратом регистрировали увеличение интенсивности окрашивания в течение 10 минут. Далее тест-полоски обрабатывали, как описано в разделе 2.2.23.

2.2.26. Увеличение размера маркера

Для увеличения размера маркера были использованы два подхода – восстановление солей серебра в присутствии гидрохинона (серебряное усиление) и восстановление солей золота в присутствии пероксида водорода (золотое усиление).

Для серебряного усиления проводили ИХА *R. solanacearum* и ВСЛК, как описано в разделе 2.2.23. В качестве матрикса использовали экстракт клубней (*R. solanacearum*) или листьев (ВСЛК) картофеля. После проведения анализа тест-полоски промывали деионизированной водой. Для серебряного усиления использовали свежеприготовленные растворы лактата серебра (0,3% раствор в воде) и гидрохинона (3% раствор в натрий-цитратном буфере, рН = 4,0). При прямом способе введения смешивали лактат серебра и гидрохинон (объемное соотношение 1:1) непосредственно перед использованием и вносили 10 мкл на тестовую зону мембраны. При непрямом способе введения растворы лактата серебра и гидрохинона наносились на две стекловолоконные мембраны (3 мкл/мм) и высушивались в течение 6 часов при 25°C без доступа света. Далее стекловолоконные мембраны нарезали (2 x 2 мм) и накладывали на тестовую зону, после чего добавляли 100 мкл воды / 0,3% лактата серебра / 3% гидрохинона для вымывания реагентов из стекловолоконных мембран и инициации реакции. Реакцию проводили в течение 5 минут, затем для ее остановки добавляли 20 мкл 0,5 М раствора хлорида натрия в воде. Далее тест-полоски сканировали и обрабатывали, как описано в разделе 2.2.23.

Для золотого усиления на тест-полоске проводили ИХА проб, как описано в разделе 2.2.23. После ИХА на тестовую зону наносили 10 мкл усиливающего раствора (см раздел 2.2.12) и выдерживали в течение 1 минуты. Тест-полоски отмывали в дистиллированной воде и определяли интенсивность окрашивания тестовой зоны, как описано в разделе 2.2.23.

2.2.27. Мультипороговый иммунохроматографический анализ

МАТ (клоны 3G4 и 1A5) и ПАТ к ХВК в различных концентрациях (от 0,1 до 1 мг/мл в ФБС) наносили в виде трех тестовых зон на нитроцеллюлозную мембрану Millipore 75. В контрольную зону наносили антитела кролика против иммуноглобулинов мыши (1 мг/мл в ФБС с 5 % глицерином). Конъюгат МЧ с МАТ клона 3G4 (см. раздел 2.2.14) (20 мкл) смешивали с пробой (100 мкл) и выдерживали 10 минут, после чего в смесь помещали тест-полоску и проводили анализ, как описано в главе 2.2.23. В случае магнитного концентрирования конъюгат МЧ (20 мкл) смешивали с пробой (1000 мкл) и инкубировали 25 минут при постоянном перемешивании. Далее с помощью магнита МЧ концентрировали, ресуспендировали в 100 мкл ФБС-Т и проводили анализ, как описано в разделе 2.2.23.

2.2.28. Иммунохроматографический анализ для определения общей вирусной зараженности

Для иммунохроматографического определения общей вирусной зараженности в тестовую зону наносили смесь пяти антител против ХВК, МВК, СВК, УВК и ВСЛК в концентрациях по 0,5 мг/мл (суммарная концентрация антител 2,5 мкг/мл). Для формирования контрольной зоны использовали раствор белка А с концентрацией 0,5 мг/мл. Нанесение иммунореагентов на мембрану проводили так же, как в разделе 2.2.21.

Тестирование проб на содержание вирусов проводили, как описано в разделе 2.2.23. Формирование окраски тестовой зоны свидетельствует о присутствии в пробе одного из пяти патогенов.

2.2.29. Мультиплексный иммунохроматографический анализ в точечном формате

Для нанесения антител в точечном формате использовали диспенсер Biodot AD1520 («Biodot», Великобритания). Для формирования точечных зон антитела к фитопатогенам вирусной (ХВК, МВК, СВК, У⁰ВК, У^NВК, ВСЛК) и бактериальной природы (*P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *C. michiganensis*, *D. solani*) в концентрациях 1,5 мг/мл в ФБС точно наносили на нитроцеллюлозную мембрану CNPC-12. Объем нанесения – 40 нл, расстояние между зонами – 1,2 мм. Размер тестовой зоны ≈ 300 мкм. Белок А в концентрации 0,5 мг/мл в ФБС наносили в виде ряда точек, формируя контрольную зону. Схема расположения зон представлена на рис. 9.

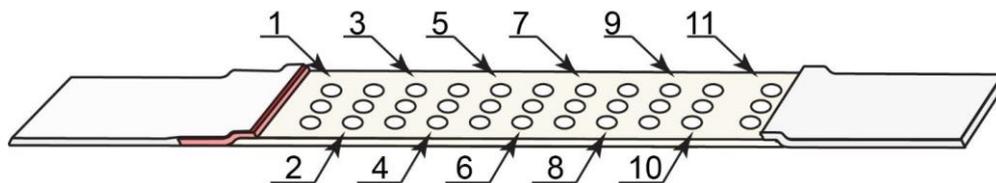


Рис. 9. Схема расположения зон связывания в мультиплексном ИХА в точечном формате. 1-10 – тестовые зоны с антителами, специфичными к: 1 – ВСЛК; 2 – Y^N ВК; 3 – Y^O ВК; 4 – SBK; 5 – MBK; 6 – XBK; 7 – *D. solani*; 8 – *C. michiganensis*; 9 – *P. carotovorum*; 10 – *P. atrosepticum*; 11 – белок А (контрольная зона)

Смесь десяти конъюгатов НЧЗ с антителами (для каждого конъюгата $A_{520}=10$) наносили на стекловолоконную мембрану (ширина 5 мм) в количестве 1,6 мкл/мм. Мембраны сушили при 37°C не менее 6 часов, после чего собирали мультимембранный композит из впитывающей мембраны для образца (GFB-R4), мембраны с конъюгатом, нитроцеллюлозной мембраны и впитывающей мембраны (AP045). Для получения иммунохроматографических тест-полосок (5 мм) мультимембранный композит нарезали с использованием автоматической гильотины Index Cutter-1 («A-Point Technologies», США). Тест-полоски упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги, содержащие силикагель. Мультиплексный ИХА проводили так же, как обычный ИХА (раздел 2.2.23), а серебряное усиление - как описано в разделе 2.2.26.

2.2.30. Референсные методы

Для подтверждения качественных и количественных результатов ИХА использовали коммерческие иммуноферментные и иммунохроматографические наборы для определения X M, S, Y^N и Y^O ВК и ВСЛК («Bioreba», Швейцария). Анализ проводили согласно рекомендациям производителей.

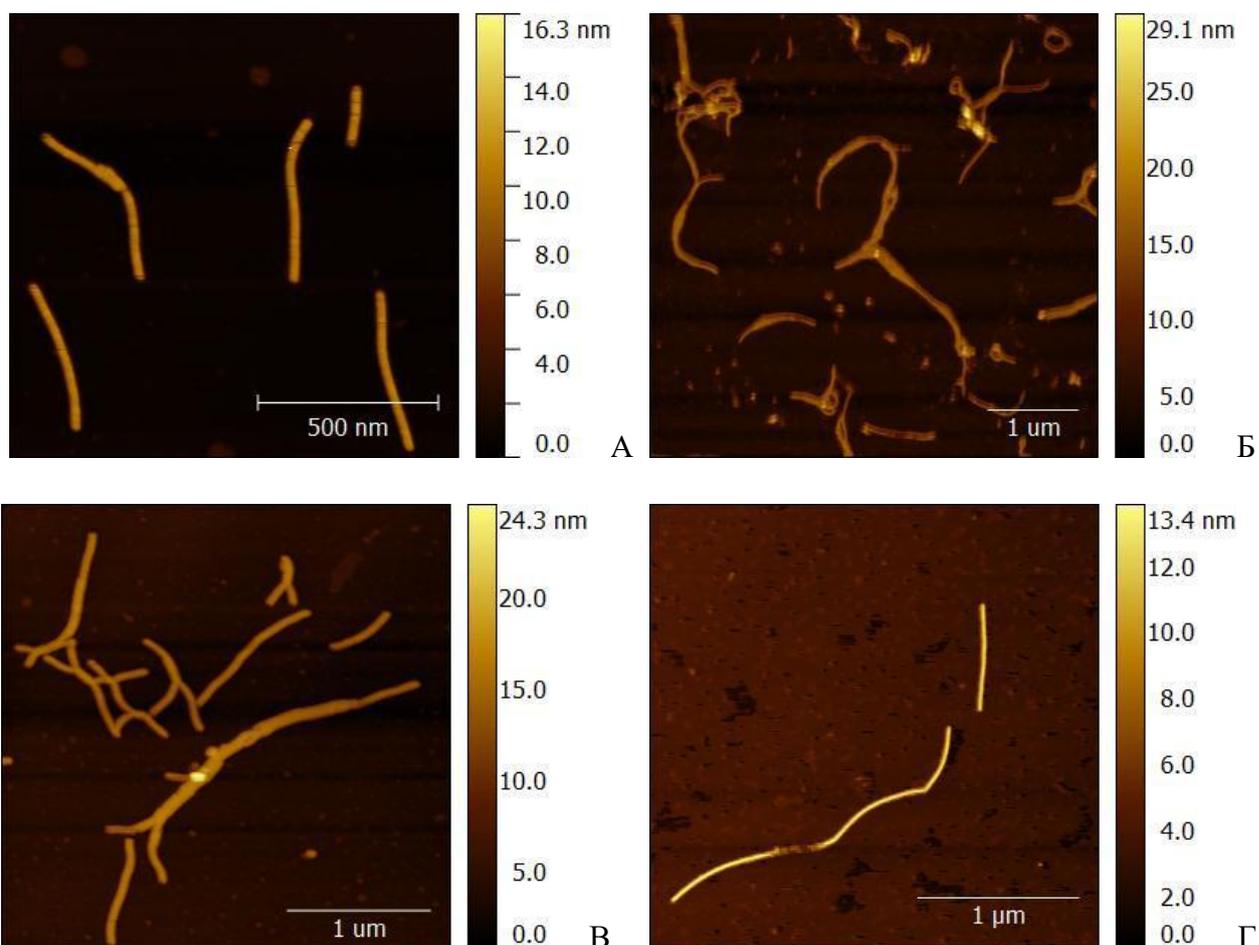
Для подтверждения биовара *R. solanacearum* использовали метод полимеразной цепной реакции [180]. Эксперименты проведены Н.В. Дреновой (Всероссийский центр карантина растений).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Характеристика фитопатогенов и иммунореагентов

3.1.1. Характеристика морфологии фитопатогенов вирусной и бактериальной природы методом атомно-силовой микроскопии

Для исследования морфологии вирусных частиц и бактериальных клеток, подтверждения их корпускулярной структуры и чистоты препаратов проведена визуализация вирусных и бактериальных фитопатогенов методом АСМ (рис. 10).



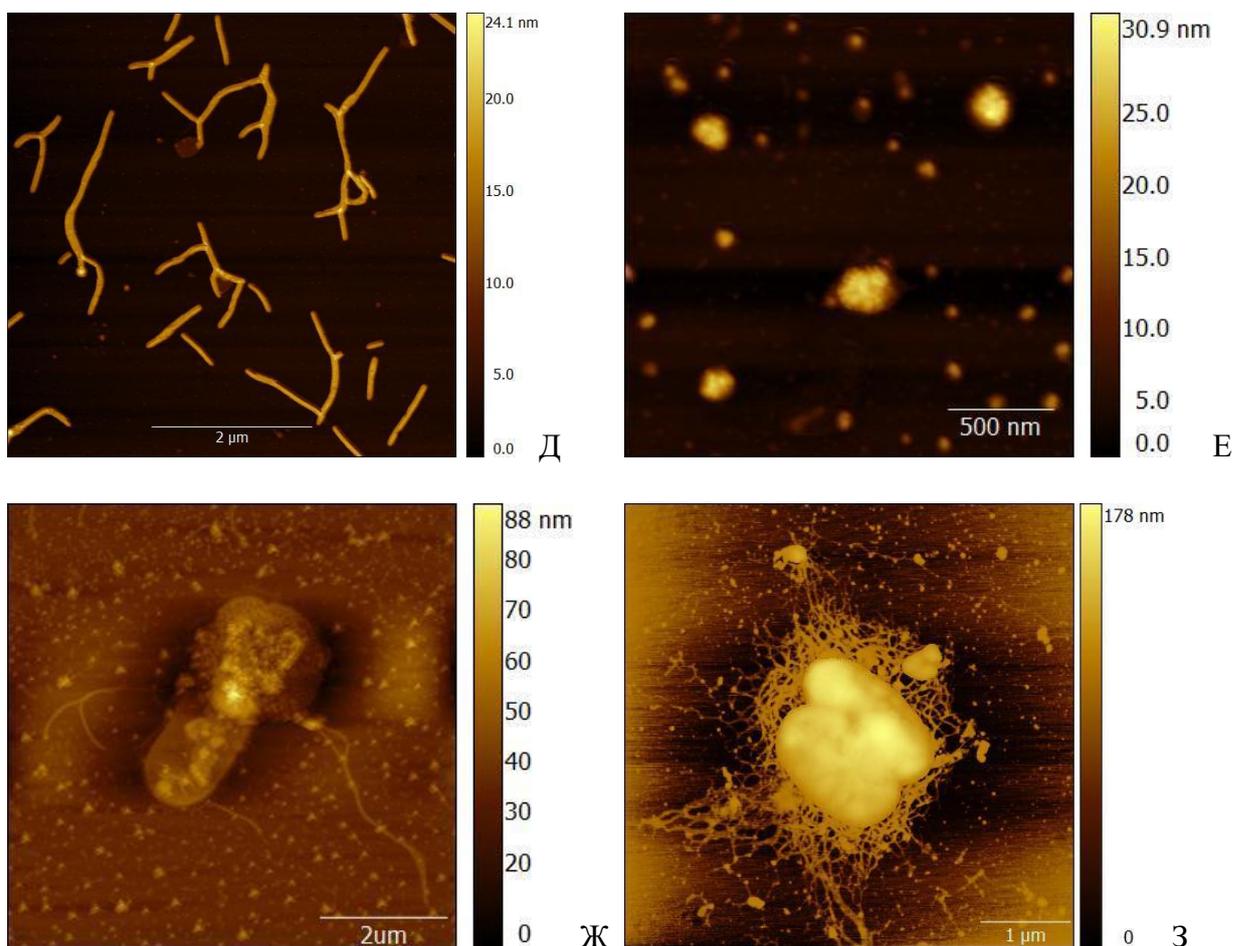


Рис. 10. Изображения фитопатогенов вирусной и бактериальной природы, полученные методом АСМ. А – ХВК; Б – УВК; В – АВК; Г – СВК; Д – МВК; Е – ВСЛК; Ж – *D. solani*. З – *R. solanacearum*

ХВК (*Tymovirales, Alphaflexiviridae, Potexvirus*). Согласно полученным данным (рис. 10, А), размер частиц в препарате варьирует от 280 (одиночные частицы) до 750 нм (крупные агрегаты). Средняя длина одиночных вирионов составляет 470 нм, диаметр 12 нм. Частицы нитевидной формы. Полученные размеры и морфология ХВК соответствуют литературным данным (метод ПЭМ, длина 515 нм, диаметр 11,5 нм) [143].

УВК, АВК (*Potyviridae, Potyvirus*). В препарате УВК (рис. 10, Б) присутствует большое количество агрегатов вирусных частиц. Размер агрегатов варьирует от 0,8 до 4 мкм. Средняя длина одиночных вирусных частиц составляет 710 нм, диаметр 12 нм. Частицы нитевидной формы. Полученные методом АСМ размеры и морфология вирионов УВК соответствуют литературным данным (метод ПЭМ, длина 730 нм, диаметр 10,5 нм) [144]. В препарате АВК выявлено большое количество агрегатов с размером от 0,7 до 3 мкм (рис. 10, В). Средняя длина одиночных вирусных частиц составляет 720 нм, диаметр 14 нм. Размеры и морфология единичных вирионов АВК соответствуют литературным данным (метод ПЭМ, длина 730 нм, диаметр 15 нм) [181].

SBK, MBK (*Betaflexiviridae, Quinvirinae, Carlavirus*). Методом АСМ показано, что в препарате SBK присутствуют агрегаты вирусных частиц размером до 3 мкм. Средний размер отдельных частиц составляет 640 нм, диаметр 12 нм (рис. 10, Г). Частицы нитевидной формы. Полученные размеры и морфология единичных вирионов SBK соответствуют литературным данным (метод ПЭМ, длина SBK составляет 650 нм, диаметр 12 нм) [182]. В препарате MBK также выявлены агрегаты размером до 3 мкм. Средний размер одиночных вирусных частиц - 640 нм, диаметр 14 нм (рис. 10, Д). Частицы нитевидной формы. Определенные нами размеры и морфология MBK соответствуют литературным данным (метод ПЭМ, длина MBK составляет 650 нм, диаметр 12 нм) [182].

BSLK (*Luteoviridae, Polerovirus*). Показано, что в препарате BSLK присутствуют агрегаты вирусных частиц размером до 300 нм (рис. 10, Е). Средний диаметр отдельных вирусных частиц составляет 30 нм, форма частиц – сферическая. Размеры и морфология BSLK соответствуют литературным данным (метод ПЭМ, средний размер частиц составляет 25 нм) [183].

D. solani (*Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae*). Методом АСМ показано, что бактериальные клетки имеют размер 1-2,5 мкм и содержат жгутики (рис. 10, Ж). Размер и морфология бактериальных клеток (рис. 11 Ж) соответствуют данным, представленным в работе Lisicka и соавт. [184].

R. solanacearum (*Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae*). Бактериальные клетки имеют размер 1-2 мкм и содержат жгутики (рис. 10, З). Размер и морфология отдельной бактериальной клетки соответствуют литературным данным [185].

Во всех препаратах вирусных частиц методом АСМ показано присутствие небольшого количества мелких частиц (размер менее 5 нм), что связано с процессами структурных перестроек вирионов (сборки/диссоциации белковых молекул в нуклеопротеидные комплексы при различных условиях среды – рН, ионная сила, диссоциация при адсорбции на поверхность и др.) [186]. Такие компоненты описаны для различных вирусов [187]. Диссоциации белков оболочки вируса приводит к изменению вторичной, третичной и четвертичной структуры вириона, что может привести к изменению аффинности взаимодействия с иммунореагентами [8, 188]. Однако полученные данные свидетельствуют о присутствии дезагрегированных вирионов в минимальных количествах, не оказывающих существенного влияния на общие характеристики взаимодействий.

3.1.2 Характеристика иммунореагентов

3.1.2.1. Характеристика сывороток

Было получено восемь сывороток иммунизированных кроликов. Для определения титра сывороток использовали метод ИФА. Полученные результаты представлены на рис. 11 и в табл. 3.

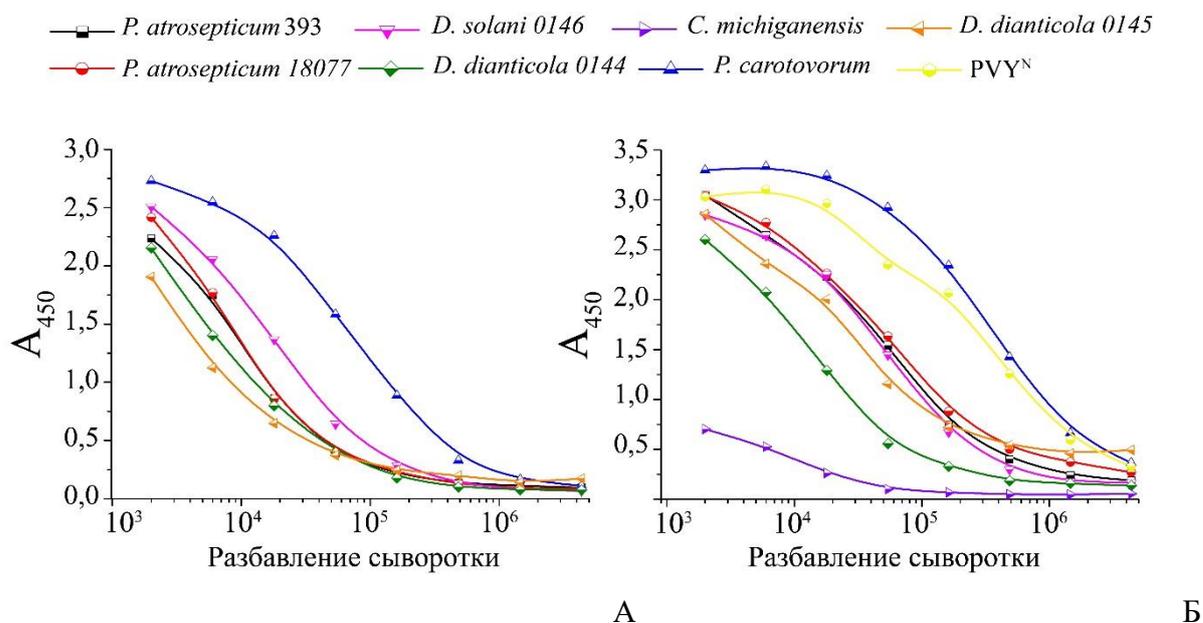


Рис. 11. Определение титров сывороток методом ИФА. А – первый отбор крови. Б – второй отбор крови.

Табл. 3. Титры сывороток иммунизированных кроликов после первого, второго и третьего отбора крови для различных фитопатогенов

Патоген	Титры сывороток		
	Первый отбор крови	Второй отбор крови	Третий отбор крови
<i>P. atrosepticum</i> 393	10^5	10^6	10^6
<i>P. atrosepticum</i> 18077	10^5	5×10^6	5×10^6
<i>P. carotovorum</i>	10^6	5×10^6	5×10^6
<i>D. solani</i> 0146	5×10^5	5×10^5	5×10^5
<i>D. diantocola</i> 0144	10^5	2×10^5	2×10^5
<i>D. diantocola</i> 0145	10^5	10^6	10^6
Y ^N ВК	-	$>10^6$	$>10^6$
<i>C. michiganensis</i>	-	2×10^4	10^4

Показано 2-50 кратное увеличение титров между первым и вторым отбором (табл. 3). Титры сывороток между вторым и третьим отбором не отличаются. В работе Wetter [182] показано, что титры сывороток для Y вируса картофеля находятся в пределах от 16×10^3 до 2×10^6 . При этом внутримышечная инъекция патогена с адьювантом позволяет получить сыворотки со значительно более высокими титрами по сравнению с внутривенным введением. По данным Slack [176], титр сывороток животных, иммунизированных фитопатогенными бактериями, возрастает в течение 10 недель после первой инъекции и достигает значения $1,6 \times 10^4$. В работе Przewodowski и Przewodowska [189] получена сыворотка против *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* с титром $1,3 \times 10^5$.

Полученные сыворотки имеют высокий титр, сопоставимый, а в ряде случаев превосходящий ранее опубликованные значения для данных фитопатогенов. Показано увеличение титра сывороток между последовательными отборами крови. Из сывороток, показавших наибольший титр (сыворотки второго и третьего отбора крови), были выделены антитела для использования в иммунохимических методах анализа.

3.1.2.2. Получение и характеристика Fab-фрагментов антител

Для получения Fab-фрагментов мАт клона 3G4 инкубировали с папаином, иммобилизованным на агарозе. Папаин гидролизует молекулы IgG с формированием двух Fab- и одного Fc-фрагмента и смеси низкомолекулярных продуктов [190]. Методом электрофореза в ПААГ охарактеризовали исходный препарат мАт, папаиновый гидролизат и очищенные Fab-фрагменты (рис. 12).

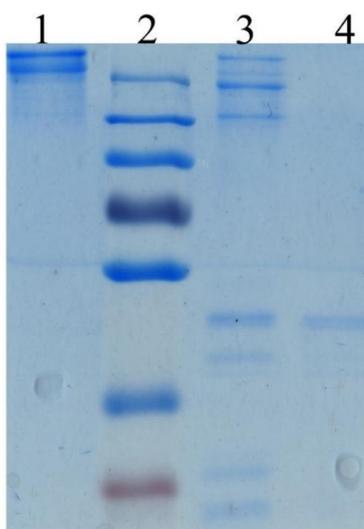


Рис. 12. Результаты электрофореза антител и их фрагментов в ПААГ в невозстанавливающих условиях. 1 – мАт клона 3G4, 2 – маркеры молекулярной массы (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25 кДа), 3 – папаиновый гидролизат, 4 – папаиновый гидролизат после очистки на колонке с белком А и последующего диализа

Показано большое количество продуктов (молекулярная масса от 20 до 150 кДа, дорожка 3) гидролитического расщепления IgG. Присутствие высокомолекулярных белков (100-150 кДа) свидетельствует о неполном гидролизе и присутствии молекул антител. Для очистки Fab-фрагментов использовали колонку с иммобилизованным белком А. Белок А специфично связывает Fc-фрагмент антител и был использован для удаления негидролизированных молекул IgG [191]. Согласно литературным данным, Fab мАт в невосстанавливающей фазе мигрируют в виде полосы с молекулярной массой 45-50 кДа [156]. Очистка папинового гидролизата на колонке с белком А и последующим диализом для удаления низкомолекулярных продуктов гидролитического расщепления позволила получить на геле только одну окрашенную полосу (около 50 кДа), соответствующую Fab-фрагментам. Полученные результаты (дорожка 4) подтверждают присутствие Fab-фрагментов и отсутствие примесей.

3.1.2.3. Специфичность антител

Специфичность антител характеризует их способность взаимодействовать с целевым антигеном, несмотря на присутствие близких по структуре аналогов. Кросс-реактивность, напротив, означает возможность антител связываться с нецелевым антигеном, что приводит к ложноположительным результатам анализа [2]. Определение кросс-реактивности антител необходимо для оценки взаимодействия с неспецифичными патогенами картофеля. Измерение кросс-реактивности антител является общей задачей для всех иммунохимических методов. Результаты кросс-реактивности мАт клона 3G4 и пАт антител к ХВК к другим широко распространённым и сходным по структуре и строению вирусам представлены в табл. 4.

Табл. 4. Кросс-реактивность антител к ХВК по отношению к другим вирусам

Антитела	Вирус					
	Y ^O ВК	Y ^N ВК	SBK	MBK	ABK	BSLK
	кросс-реактивность, %					
мАт клона 3G4 к ХВК	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
пАт к ХВК	0,3	<0,1	0,3	<0,1	<0,1	<0,1

Как видно из табл. 4, мАт к ХВК не связывают неспецифичные вирусы в концентрациях до 1000 нг/мл (кросс-реактивность мАт менее 0,1%). ПАт связывают Y^OВК и SBK в концентрации 1000 нг/мл. Таким образом, пАт к ХВК имеют меньшую

специфичность (большую кросс-реактивность) по сравнению с МАТ клона 3G4, что согласуется с литературными данными. В работе Patel и соавт. [192] показано, что ПАТ к вирусу папилломы человека (тип 16) способны связываться с близкородственными 1, 2, 6 и 11 типами, в то время как МАТ абсолютно специфичны к типу 16. Guo и соавт. [193] показали высокое значение кросс-реактивности ПАТ к различным штаммам вируса гриппа. В некоторых случаях выявлена кросс-реактивность антител по отношению к неблизкородственным антигенам. Например, в работе Olszewska и Steward [194] показано, что ПАТ к вирусу мозаики коровьего гороха (*Picornavirales, Secoviridae, Comovirinae, Comovirus*) способны взаимодействовать с неблизкородственным вирусом кори (*Mononegavirales, Paramyxoviridae, Morbillivirus, Measles morbillivirus*). Кросс-реактивность связана со сходной первичной структурой белков оболочки двух вирусов – наличие участка из 7 аминокислот, включающего 3 идентичные аминокислоты и 4 переменные. В работе Liu и соавт. [195] показано присутствие в сыворотке человека антител, реагирующих с белком оболочки вируса табачной мозаики. Первичная структура фрагмента белка вируса табачной мозаики имеет аналогичную первичную структуру с белком TOMM40L (белок наружной мембраны митохондрий) – 6 последовательно расположенных идентичных аминокислот.

Для объяснения кросс-реактивности использованных в работе ПАТ к ХВК сравнивали первичную последовательность белка оболочки ХВК (GenBank AAV27212.1) и остальных вирусов с использованием программного обеспечения BLAST. В результате сравнения получены следующие результаты:

- белки оболочки ХВК и SBK (GenBank: AAB23461.2) имеют совпадающий участок аминокислотной последовательности, состоящий из 9 аминокислот - YAPVVWN+ML для ХВК (130-139 а.к.), SBK (190-199);
- белки оболочки ХВК и YBK (GenBank CUI25751.1) имеют сходный участок аминокислотной последовательности – MPGLIR для ХВК (175-182), YBK (181-188) и ATSGTP для ХВК (27-36), YBK (36-45);
- белки оболочки ХВК и MBK (GenBank ADH52722.1) имеют два идентичных участка аминокислотной последовательности – FAAFD для ХВК (159-163), MBK (228-232) и EGLIR для ХВК (178-182), MBK (247-251);
- белки оболочки ХВК и АВК (NCBI reference sequence NP_734368.1) и ВСЛК (GenBank BAA00419.1) не имеют сходных последовательностей.

ПАТ к ХВК проявляют наибольшую кросс-реактивность при наличии совпадающих последовательностей аминокислот в белке оболочки вирусов (Y⁰ВК и SBK). Полученные данные по сравнению первичных структур белков оболочек вирусов подтверждают

экспериментальные результаты исследования кросс-реактивности (табл. 4). Наблюдаемая кросс-реактивность имеет под собой молекулярно-генетическую основу.

Комбинирование пАт и мАт в «сэндвич»-формате ИХА может быть использовано для увеличения специфичности анализа относительно ИХА с пАт. Формирование «сэндвич» комплекса происходит только в том случае, когда и иммобилизованные в тестовой зоне, и адсорбированные на поверхность маркера антитела связывают антиген в пробе. Даже если пАт способны взаимодействовать с неспецифичным антигеном, формирование детектируемых иммунных комплексов происходить не будет, поскольку мАт имеют низкую кросс-реактивность. Таким образом, совместное использование пАт и мАт в «сэндвич» формате ИХА предотвращает риски ложноположительного результата анализа.

3.1.2.4. Иммуноферментный анализ фитопатогенов вирусной и бактериальной природы

Все антитела, полученные из сывороток (*D. solani*, *D. dianticola*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, Y^NВК), и антитела, полученные ранее во ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ХВК, АВК, SBK, MBK Y^OВК, ВСЛК, *R. solanacearum*, *C. michiganensis*), были охарактеризованы методом ИФА. Пределы обнаружения ИФА суммированы в табл. 5.

Табл. 5. Пределы обнаружения ИФА фитопатогенов вирусной и бактериальной природы

Патоген	Предел обнаружения, нг/мл (вирусы), кл./мл (бактерии)
ХВК	3 (для мАт клона 3G4) 5 (для мАт клона 1A5) 3 (для пАт)
ВСЛК	3
Y ^N ВК	8
Y ^O ВК	16
АВК	30
SBK	8
MBK	8
<i>R. solanacearum</i>	6x10 ³
<i>C. michiganensis</i>	10 ³
<i>D. solani</i>	10 ⁵
<i>D. dianticola</i>	10 ⁵
<i>P. carotovorum</i>	10 ⁵
<i>P. atrosepticum</i>	10 ⁵

Согласно требованиям нормативной документации РФ (ГОСТ 33996 – 2016 «Картофель семенной Технические условия и методы определения качества»), предел обнаружения ИФА и ИХА должен составлять 10 нг/см^3 для фитопатогенов вирусной природы и 10^4 кл./см^3 бактериальной природы в листьях и клубнях картофеля, соответственно. Для ряда патогенов (например, Y⁰BK, ABK, *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*) достигнутые пределы обнаружения оказываются недостаточными. Применение ИФА в рутинном скрининге также ограничено длительностью анализа (1-3 часа), большим количеством стадий отмывки/добавления реагентов, необходимостью использования стационарного оборудования (устройства для промывки, фотометра). Таким образом, снижение предела обнаружения остается актуальной задачей.

3.1.2.5. Характеристика взаимодействия X вируса картофеля с антителами и Fab-фрагментами методом поверхностного плазмонного резонанса

Для изучения кинетических параметров иммунного взаимодействия мАт клона 3G4 ковалентно иммобилизовали на поверхность чипа с декстрановым покрытием. Для успешной иммобилизации необходимо подобрать условия, позволяющие молекулам антител сближаться с поверхностью чипа [23]. Основной вклад в этот процесс вносят электростатические силы взаимодействия между молекулами антител и декстрановым слоем на поверхности чипа. Поскольку заряд молекул антитела зависит от значения рН, предварительно оптимизировали состав буфера для иммобилизации. Для выбора значения рН буфера изучали изменение сигнала сенсора после введения антител (рис. 13). Наибольший сигнал сенсора достигается при значении рН, соответствующему максимальному электростатическому притяжению заряженных молекул, что позволяет антителам связываться с поверхностью чипа.

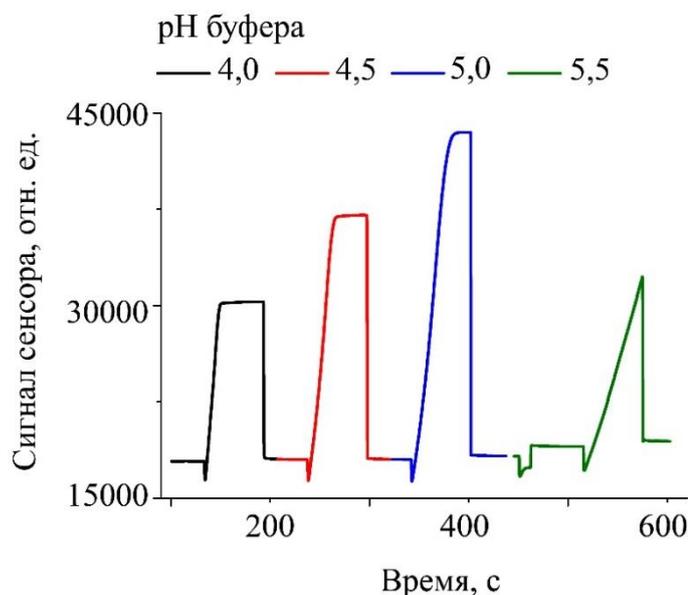


Рис 13. Сенсограмма при различных значениях pH буфера для иммобилизации антител

Наибольший сигнал сенсора наблюдался для буфера с pH = 5 (рис. 13). Изменение pH на 0,5 (до 4,5 или 5,5) приводит к снижению сигнала, что объясняется меньшим количеством связавшихся с поверхностью чипа антител из-за электростатических сил отталкивания. Дальнейшее снижение значения pH буфера приведет к подавлению диссоциации карбоксильных групп на поверхности чипа и уменьшению электростатических сил притяжения. При значении pH равном 5,0 обеспечивается оптимальное соотношение зарядов поверхности чипа и молекул антител, рекомендуемое для ковалентной иммобилизации (рис. 13).

После иммобилизации антител в систему вводили ХВК (10 мкг/мл). На поверхности чипа происходит формирование иммунных комплексов – иммобилизованные антитела – ХВК, что сопровождается увеличением сенсорного сигнала ≈ 300 относительных единиц (рис. 14, введение вируса отмечено стрелкой 1). При добавлении свободных антител на поверхности чипа происходит формирование тройных иммунных комплексов – иммобилизованные антитела – ХВК – антитела и увеличение сигнала сенсора на ≈ 480 относительных единиц (рис. 14, введение антител отмечено стрелкой 2). Зона падения сигнала соответствует диссоциации иммунных комплексов ХВК – свободные антитела. Введение регенерирующего буфера, pH = 2,0 (стрелка 3 на рис. 14) приводит к диссоциации иммунных комплексов на чипе. В результате наблюдается резкое снижение сигнала и стабилизация на уровне до введения вируса и антител (точка 1).

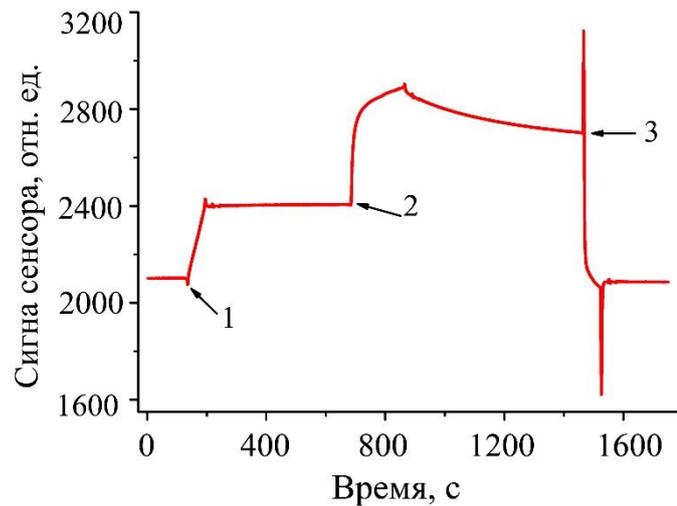


Рис.14. Сенсограмма сборки тройного иммунного комплекса иммобилизованные антитела – ХВК – антитела. Стрелками отмечено введение: 1 – вируса, 2 – антител, 3 – регенерирующего буфера, рН=2,0

Для определения кинетических и равновесных констант диссоциации варьировали концентрации добавляемых к чипу с антигеном растворов антител и Fab-фрагментов. Полученные сенсограммы представлены на рис. 15. Константы иммунохимических реакций были рассчитаны с помощью линеаризации концентрационных зависимостей в стандартных координатах. Полученные константы суммированы в табл. 6 (n=2).

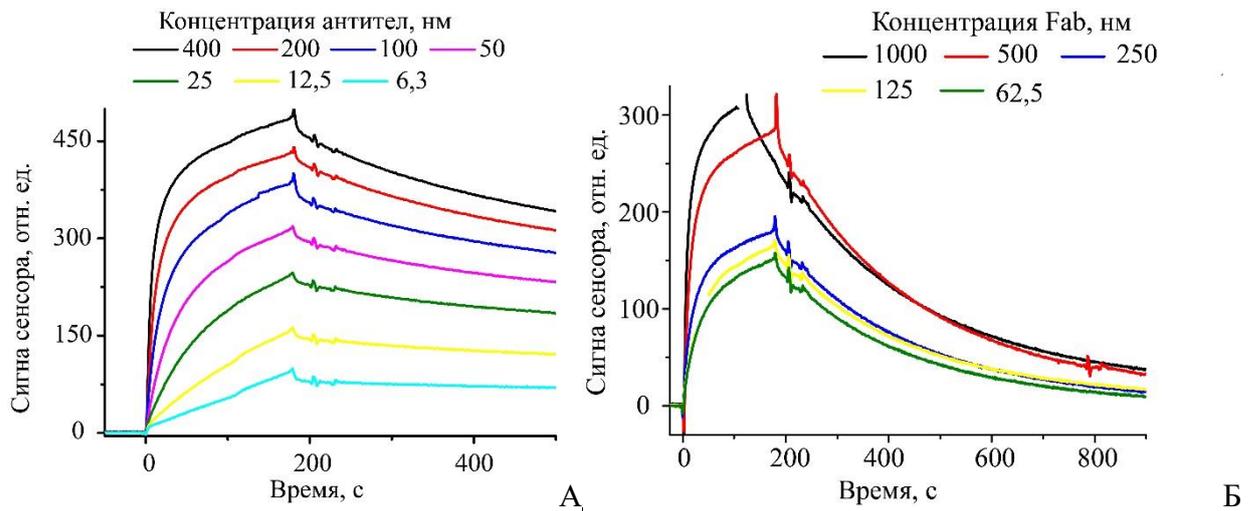


Рис. 15. Сенсограммы взаимодействия ХВК с мАт клона 3G4 (А) и Fab-фрагментами (Б) при разных концентрациях иммунореагентов

Табл.6. Кинетические и равновесные константы ассоциации и диссоциации антител и Fab-фрагментов с ХВК

Иммунореагент	$k_a, 1/(M\cdot c)$	$k_d, 1/c$	$K_a, 1/M$	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 клона 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	$(3,7\pm 0,3)\times 10^4$	$(3,2\pm 0,5)\times 10^{-4}$	$(1,1\pm 0,2)\times 10^8$	$(8,6\pm 1,5)\times 10^{-9}$

Равновесная константа диссоциации для Fab-фрагментов примерно в три раза больше по сравнению с антителами. Полученный результат объясняется более слабым моновалентным взаимодействием Fab-фрагментов с вирионами по сравнению с антителами. Антитела (IgG) могут связываться с вирионами бивалентно за счет двух Fab-фрагментов. Схожие результаты получены в работе Zhou и соавт. [196]. На панели из девяти моноклональных антител к рецептору эпидермального фактора роста было показано, что Fab фрагменты имеют в 2-3938 раза большее значение равновесной константы диссоциации по сравнению с исходными антителами. В литературе имеются единичные публикации о влиянии аффинности антител на предел ИХА. В работе Xie и соавт. [197] показано, чем выше аффинность антител, тем ниже предел обнаружения ИХА сальбутамола – для антител с равновесной константой ассоциации (K_A) = $1,27\times 10^{12} M^{-1}$ ПО равен 1 нг/мл, для антител $K_A=8,52\times 10^{11} M^{-1}$ ПО равен 1,5 нг/мл, для антител с $K_A = 4,61\times 10^9 M^{-1}$ ПО составляет 10 нг/мл. В работе Safenkova и соавт. [23] показано, что использование мАТ с большей равновесной константой ассоциации (≈ 3 раза) при оптимальных условиях ИХА позволяло снизить предел обнаружения в 3 раза. Однако Mosley и соавт. [198], использовавшие метод введения радиоактивной метки для измерения констант взаимодействия в условиях проточного режима конкурентного формата ИХА, установили, что метод поверхностного плазмонного резонанса дает ≈ 780 -кратное завышение значения кинетических констант ассоциации по сравнению с эффективными константами, получаемыми в условиях ИХА ($5,64\times 10^5$ и $7,26\times 10^2 M^{-1}\cdot c^{-1}$, соответственно). Разница в скоростях ассоциации авторы объясняют стерическими затруднениями связывания между антителами на НЧЗ и связанным в тестовой области антигеном.

Несмотря на то, что кинетические константы взаимодействия в условиях ИХА могут отличаться от измеренных, метод поверхностного плазмонного резонанса позволяет оценить максимальную скорость взаимодействия антиген-антитело и выбрать иммунореагенты, обладающие наибольшей аффинностью. Для разработки высокочувствительных иммунных методов анализа необходимо использовать антитела,

обладающие минимальной кинетической константой диссоциации и наибольшей кинетической константой ассоциации с антигеном. С учетом специфики ИХА (неравновесные условия, малое время взаимодействия с антигеном в пробе) решающее значение имеет скорость формирования иммунных комплексов (кинетическая константа ассоциации). Вследствие малого времени ИХА, количеством диссоциированных поливалентных иммунных комплексов можно пренебречь. Таким образом, использование нативных антител оказывается предпочтительным для высокочувствительного иммуноанализа. Антитела с меньшей кинетической константой ассоциации могут успешно использоваться в методах, включающих продолжительную инкубацию с антигеном (например, ИФА).

3.1.2.6. Изучение формирования иммунных комплексов X вируса картофеля с антителами и Fab-фрагментами

Фитопатогены являются поливалентными антигенами и способны формировать с антителами гетерогенные по составу и структуре иммунные комплексы. Для работы использовали систему ХВК – мАт. При одинаковых условиях (температура, рН, ионная сила, концентрация детергентов) структура и состав вирусных частиц постоянны [199]. Моноклональные антитела характеризуются одинаковой аффинностью и способностью связываться только с одним эпитопом [156]. Поэтому система ХВК – мАт позволяет установить закономерности формирования иммунных комплексов при разных соотношениях антител и вирусных частиц. При рассмотрении иммунного взаимодействия необходимо также учитывать валентность антител и Fab-фрагментов. Антитела класса IgG бивалентны и способны взаимодействовать с двумя разными вирионами, что приводит к образованию крупных иммунных комплексов и их преципитации [156].

В работе также изучали иммунные комплексы, формирующиеся при взаимодействии антител с Fab-фрагментами. Методом АСМ показано формирование гетерогенных комплексов при различных соотношениях вирус-антитело. Вирусные частицы являются поливалентными и способны реагировать со множеством молекул антител. Взаимодействие мАт клона 3G4 с вирусными частицами приводит к формированию крупных (1-3 мкм) иммунных комплексов гетерогенного состава. Структура иммунных комплексов при различных соотношениях была визуализирована методом АСМ. Также исследована структура комплексов ХВК с Fab-фрагментами клона 3G4. В качестве отрицательного контроля использовали неспецифичные к данному вирусу антитела (мАт к вирусу табачной мозаики). Полученные данные представлены на рис. 16. Вирионы ХВК оказываются сшитыми между собой двумя антигенсвязывающими участками антитела, при этом происходит латеральная агрегация вирусных частиц (рис. 16, Б-Е). Агрегации вирионов при

взаимодействии с Fab-фрагментами и антителами к вирусу табачной мозаики не обнаружено (рис. 16, Ж, З).

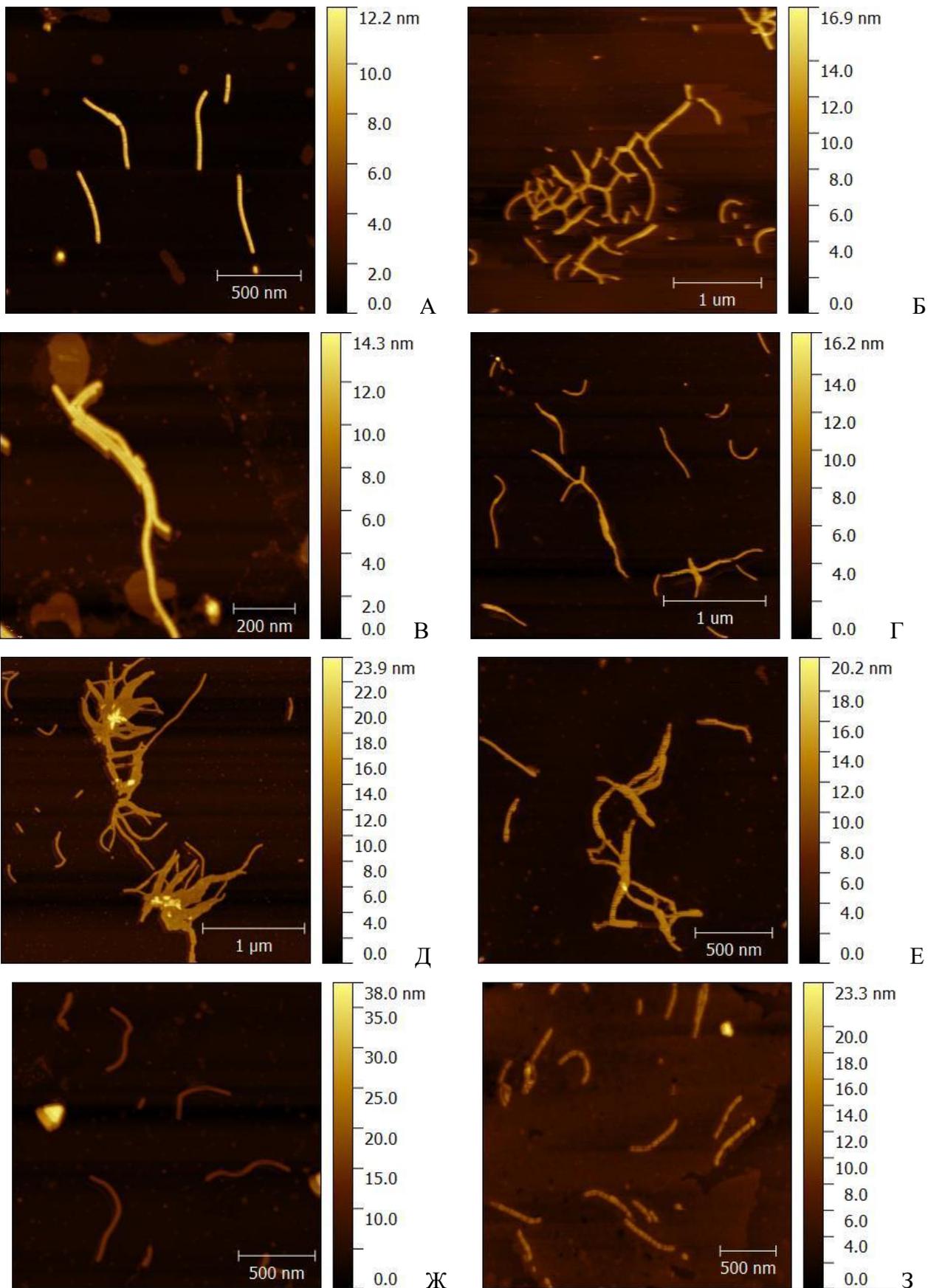


Рис. 16. Изображения вирусных частиц и иммунных комплексов при различных соотношениях ХВК-мАт, полученные методом АСМ. Исходные частицы ХВК (5 мкг/мл) без добавления антител (А) Иммунные комплексы, концентрация ХВК (5 мкг/мл), концентрация мАт клона 3G4 – 3 (Б), 30 (В), 60 (Г), 150 (Д), 210 (Е) мкг/мл. Концентрация Fab-фрагментов мАт клона 3G4 – 130 мкг/мл (Ж). Концентрация мАт специфичных к вирусу табачной мозаики, – 150 мкг/мл (З)

Для исследования формирования иммунных комплексов ХВК – мАт в гомогенных условиях использовали метод капиллярного электрофореза. Совместно с лабораторией С. Н. Крылова (Университет Йорка, Канада) изучали формирование комплексов вирионов ХВК с антителами и Fab-фрагментами. Иммунные комплексы, полученные при варьировании концентрации взаимодействующих реагентов, характеризуются разной морфологией, составом и зарядом.

Для электрофоретической характеристики иммунных комплексов равные объемы вируса (70 мкг/мл) смешивали со специфичными мАт клона 3G4 (3-1600 мкг/мл) либо их Fab-фрагментами (6-130 мкг/мл) и выдерживали в течение 60 минут. Результаты капиллярного электрофореза ХВК (70 мкг/мл), мАт клона 3G4 (1 мг/мл) и иммунных комплексов ХВК-мАт клона 3G4 (смесь равных объемов 70 мкг/мл ХВК и 1 мг/мл мАт клона 3G4) представлены на рис. 17.

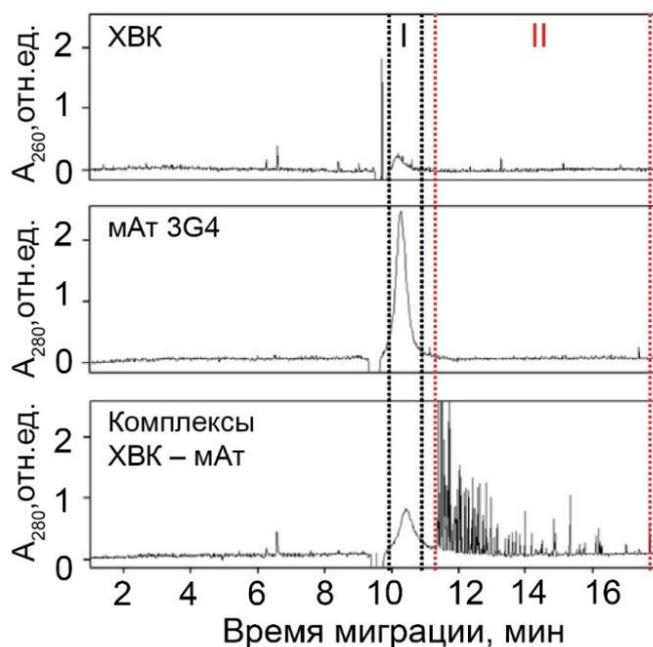


Рис. 17. Электрофореграммы вирионов, иммунореагентов и комплексов. Пунктиром обозначены границы времени миграции свободных вирусных частиц и антител (I) и иммунных комплексов (II)

Время миграции антител и вируса (11 минут) примерно совпадает (зона I, рис. 17). Электрофоретическая подвижность комплексов взаимодействующих веществ, как правило, оказывается промежуточной по сравнению с исходными реагентами [200]. Формирующиеся иммунные комплексы ХВК-мАт (область II на рис. 17) имеют бóльшую электрофоретическую подвижность по сравнению с исходными реагентами. Пики на электрофореграмме в зоне II соответствуют агрегатам с различным количеством вирусных частиц и молекул антител, что подтверждает микрогетерогенность их состава и структуры, показанную методом АСМ (рис. 16). Иммунные комплексы вирион-Fab не обладают высокой электрофоретической подвижностью. Напротив, показана ожидаемая промежуточная подвижность таких комплексов при разных соотношениях реагентов.

Таким образом, данные АСМ и капиллярного электрофореза демонстрируют образование поперечных сшивок между вирионами посредством бивалентных взаимодействий антител и формирование крупных иммунных комплексов гетерогенного состава. Коэффициент трения таких комплексов не пропорционален количеству включенных в состав вирионов, а заряд определяется количеством вирионов и антител, что приводит к увеличению электрофоретической подвижности формирующихся комплексов.

3.2. Характеристика маркеров

3.2.1. Получение и характеристика наночастиц золота

Для синтеза конъюгатов с антителами различной специфичности были получены НЧЗ. Для характеристики НЧЗ использовали методы спектрофотометрии, ДЛСР, ПЭМ, электрофоретического рассеяния света.

Спектр синтезированного препарата НЧЗ представлен на рис. 18. Максимум поглощения локализован в области 520-522 нм. В работе Khlebtsov [201] показано, что диаметр сферических НЧЗ (d , нм) определяет положение максимума поглощения (λ_{max}):

$$X = \lambda_{max} - 500$$

$$d = 3 + 7,5 \times 10^{-5} \times X^4 \quad (\text{При } X < 23)$$

$$d = \frac{(\sqrt{X-17}-1)}{0,06} \quad (\text{При } X \geq 23)$$

Вычисленный по значению максимума поглощения размер НЧЗ составляет 15-20 нм. Положение максимума, ширина и отсутствие дополнительных пиков на спектре свидетельствуют о гомогенности НЧЗ.

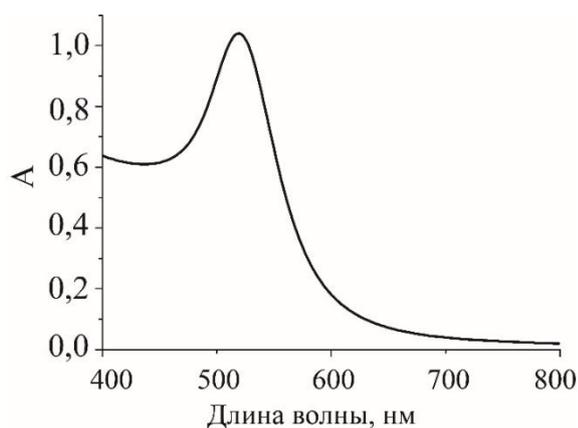


Рис. 18. Спектр препарата НЧЗ. Максимум поглощения при 520-522 нм

Для измерения диаметра НЧЗ были использованы два метода – ДЛСР и ПЭМ. ДЛСР позволяет определять гидродинамический диаметр частицы (D_h) – диаметр частицы в растворе с учетом формирования гидратных оболочек вокруг частицы, а ПЭМ – размер непосредственно самой частицы (золотого ядра). На рис. 19 показано распределение НЧЗ по размерам, установленное на основании светорассеяния.

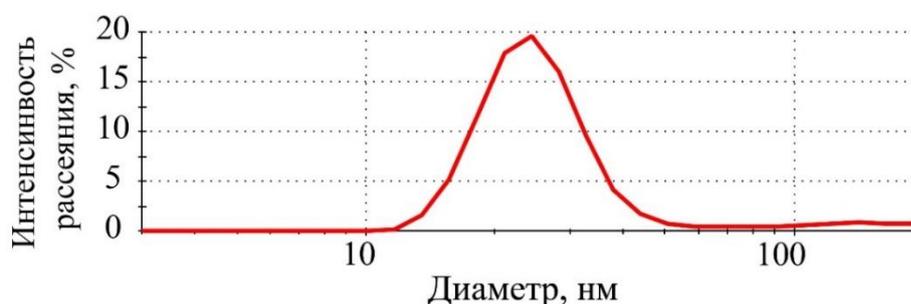


Рис. 19. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам, полученная на основании интенсивности светорассеяния методом ДЛСР

Гидродинамический диаметр НЧЗ составил $25,3 \pm 7,6$ нм. Полученные результаты ДЛСР подтверждают гомогенность НЧЗ, однако не позволяют оценить их форму. Для определения морфологии НЧЗ был использован метод ПЭМ. Микрофотография НЧЗ показана на рис. 20 А. В результате статистической обработки установлено, что НЧЗ имеют близкую к сферической форму (отношение длин осей - $1,2 \pm 0,2$), крупные агрегаты не обнаружены. Средний диаметр НЧЗ составляет $19,7 \pm 3,4$ нм. Гистограмма распределения НЧЗ по размеру представлена на рис. 20, Б.

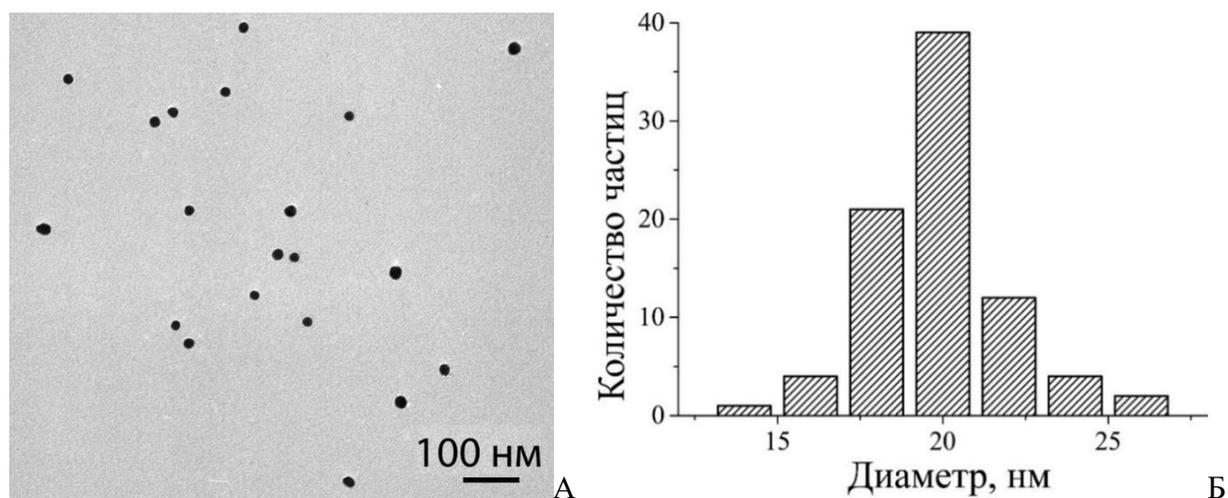


Рис. 20. Характеристика препарата НЧЗ методом ПЭМ. А – микрофотография НЧЗ. Б – гистограмма распределения НЧЗ по диаметру

Бóльший диаметр НЧЗ, полученный методом ДЛСР ($25,3 \pm 7,6$ нм) по сравнению с ПЭМ ($19,7 \pm 3,4$ нм), обусловлен вкладом гидратной оболочки частицы, который учитывает ДЛСР [202]. Преимуществом ДЛСР является возможность определения размера частиц в растворе, что исключает артефакты, связанные со стадиями высушивания и иммобилизации на подложку при подготовке проб к ПЭМ. Таким образом, синтезированные НЧЗ монодисперсны и не содержат агрегатов. В ходе работы по данной методике было синтезировано несколько препаратов НЧЗ. Установлено, что средний размер частиц отличается незначительно (± 2 нм).

Об агрегативной устойчивости препаратов НЧЗ судили по величине ξ -потенциала. Установлено, что при $\text{pH}=7,4$ ξ -потенциал НЧЗ составляет минус 31,6 мВ. Отрицательное значение обусловлено адсорбированными на поверхности НЧЗ цитрат-ионами [203]. Близкие значения ξ -потенциала для НЧЗ (минус 36 мВ), полученных методом Френса, представлены в работе Zhang и соавт. [204]. Высокое значение ξ -потенциала приводит к электростатическому отталкиванию частиц в растворе, не позволяет им формировать агрегаты, что свидетельствует об агрегативной устойчивости препарата НЧЗ. При малых значениях ξ -потенциала (менее 20 мВ по модулю) возможно сближение частиц, формирование агрегатов и выпадение в осадок. Такие препараты нестабильны при хранении и непригодны для использования в ИХА.

Полученные результаты свидетельствуют о гомогенности и агрегативной устойчивости синтезированных препаратов НЧЗ. Таким образом, полученный препарат НЧЗ пригоден для синтеза конъюгатов с биомолекулами.

3.2.2. Получение и характеристика конъюгатов наночастиц золота

Были получены конъюгаты НЧЗ с мАт и пАт различной специфичности, белком А, стрептавидином, комплексом щелочной фосфатазы с антивидовыми антителами. Для синтеза конъюгатов был использован метод физической адсорбции биомолекул на поверхности НЧЗ. Установлены оптимальные количества иммобилизуемых молекул и рН среды. Оба эти фактора оказывают влияние на стабильность и функциональную активность конъюгатов [205].

Для эффективной адсорбции молекул на поверхность НЧЗ необходимо подобрать условия, позволяющие снизить электростатическое отталкивание биомолекул и НЧЗ, и достигнуть наибольшего количества точек контакта. На примере конъюгатов НЧЗ со стрептавидином (изоэлектрическая точка – $pI \approx 5-6$), синтезированных при двух значениях рН (6,5 и 9,0), показано влияние рН на процесс иммобилизации биомолекул на поверхности НЧЗ. Определение минимальной стабилизирующей концентрации стрептавидина при разных значениях рН проводили с помощью флокуляционной кривой (рис. 21).

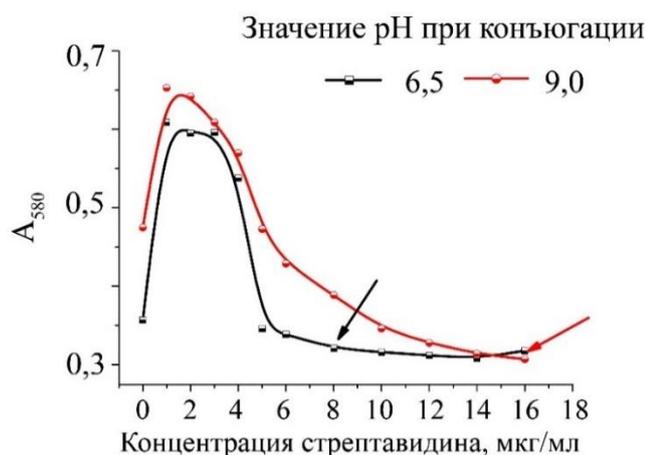


Рис. 21. Флокуляционные кривые для НЧЗ и стрептавидина при рН 6,5 и 9,0. Стабилизирующие концентрации стрептавидина отмечены стрелками

Стрептавидин адсорбировали на поверхность НЧЗ при рН = 6,5 (близко к pI) и рН = 9,0 (больше pI), после чего добавляли хлорид натрия (до 1%) и регистрировали поглощение при 580 нм (A_{580}). Флокуляционная кривая показывает стабильность конъюгатов НЧЗ с различной концентрацией адсорбированных белков при высокой ионной силе раствора. Добавление хлорида натрия вызывает сжатие двойного электрического слоя, сближение частиц и, как следствие, их агрегацию, что сопровождается ростом A_{580} [206]. При низких концентрациях адсорбированных белков покрытие НЧЗ оказывается недостаточным, чтобы предотвратить агрегацию. Увеличение количества адсорбированных белков приводит к

более полному покрытию и стабилизации частиц, что снижает их агрегацию при добавлении хлорида натрия (плавное снижение A_{580}). При достижении определенной плотности адсорбированных белков на поверхности НЧЗ происходит стабилизация препарата (плато на флокуляционной кривой). Точка выхода флокуляционной кривой на плато является минимальной стабилизирующей концентраций белка для НЧЗ при данном значении рН. Значение рН при адсорбции влияет на электростатическое взаимодействие белковых молекул и НЧЗ в растворе и в конечном итоге определяет минимальную стабилизирующую концентрацию. При конъюгации биомолекулы при значении рН значительно большем, чем рI, конъюгаты оказывались менее устойчивыми при одних и тех же концентрациях стрептавидина, сдвигалась точка выхода на плато флокуляционной кривой (8 и 16 мкг/мл для рН = 6,5 и 9,0, соответственно) (см. рис. 21). Для конъюгации использовали рН, близкий к рI для каждой молекулы. Флокуляционные кривые были получены для мАт и пАт, конъюгатов антивидовых антител с щелочной фосфатазой и белка А при адсорбции на сферические НЧЗ с размером около 20 нм. Оптимальные значения рН и минимальной стабилизирующей концентрации отличаются для разных биомолекул – для антител рН = 8,5-9 (от 10 до 15 мкг/мл), для конъюгата антител с щелочной фосфатазой рН = 9 (14 мкг/мл), для белка А рН = 6 (10 мкг/мл).

Синтезированные конъюгаты (с мАт против ХВК; с пАт против ХВК, МВК, СВК, Y^N ВК, Y^O ВК, АВК, ВСЛК, *D. solani*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *R. solanacearum*, *C. michiganensis*; стрептавидином, белком А, конъюгатом антивидовых антител с ЩФ) были охарактеризованы методами ПЭМ, ДЛСР, электрофоретического рассеяния света и спектрофотометрии. Отмечено увеличение длины волны максимального поглощения (до 525-527 нм, сдвиг около 5-7 нм) при адсорбции молекул антител на поверхность НЧЗ. Методом ПЭМ показано отсутствие агрегатов в препаратах НЧЗ – Ат. Методом ДЛСР показано увеличение диаметра частиц с $24,8 \pm 4,0$ до $56,4 \pm 10,1$ нм, обусловленное адсорбцией молекул антител на поверхность НЧЗ [207] (рис. 22). Сходные результаты по увеличению размера частиц получены и для других полученных в работе конъюгатов НЧЗ с биомолекулами (более 10 препаратов).

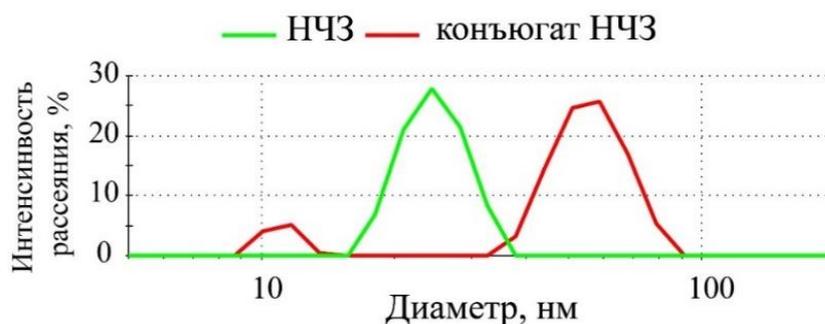


Рис. 22. Гистограммы распределения НЧЗ и конъюгата НЧЗ с антителами против *R. solanacearum* по размерам, полученные на основании регистрации светорассеяния методом ДЛСР

Полученные результаты увеличения размера НЧЗ после иммобилизации биомолекул согласуются с литературными данными. В работе James и Driskell [208] установлено, что адсорбция IgG на поверхность НЧЗ с диаметром 60 и 80 нм приводила к увеличению Dh на 22-25 нм, обусловленному формированием монослоя адсорбированных молекул IgG. Полученные данные подтверждают формирование конъюгата НЧЗ – Ат и образования монослоя адсорбированных антител. Присутствие в препарате конъюгата НЧЗ минорного пика частиц с диаметром $11,1 \pm 0,9$ нм объясняется присутствием свободного БСА, являющегося компонентом буфера для хранения конъюгатов (тБСА).

Адсорбция антител приводит к снижению ξ – потенциала частиц конъюгата (для конъюгатов НЧЗ – Ат от минус 5,8 до минус 11,2 мВ) по сравнению с НЧЗ. Снижение ξ – потенциала при иммобилизации биомолекул обусловлено экранированием ионизированных поверхностных цитратных групп (рис. 23). Схожие данные были получены для всех полученных в работе конъюгатов НЧЗ.

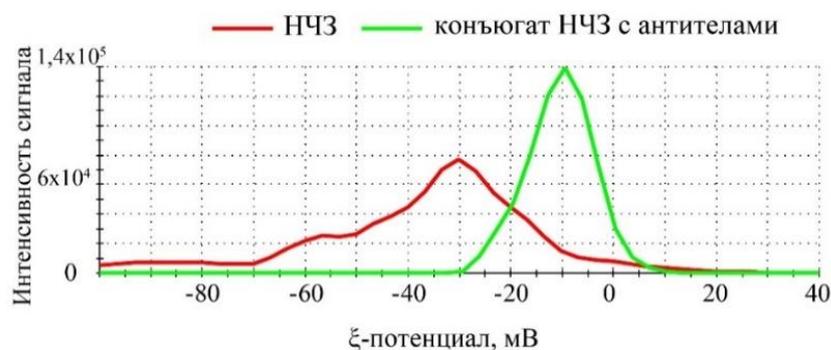


Рис. 23. Распределение НЧЗ и конъюгата НЧЗ по ξ – потенциалу

Полученные результаты изменения ξ – потенциала НЧЗ после иммобилизации антител на их поверхность согласуются с литературными данными. В работе Zhang и соавт.

[204], показано, что при иммобилизации антител на поверхности немодифицированных НЧЗ, ξ – потенциал изменялся с минус 36 мВ до минус 20 мВ для кроличьих поликлональных IgG и до минус 4 мВ для человеческих поликлональных IgG. Разница в изменении ξ – потенциал для кроличьих и человеческих IgG авторы объясняли структурой адсорбированных белков и их разным значением pI.

В работе был впервые синтезирован конъюгат НЧЗ, содержащий смесь антител разной специфичности, способный связывать пять вирусов (мультиспецифичный конъюгат). Для этого к НЧЗ (1 мл, $A_{520}=1$) добавляли пять антител разной специфичности (ХВК, МВК, СВК, УВК, ВСЛК) до конечной концентрации каждого антитела 10 мкг/мл (общая концентрация антител – 50 мкг/мл). При одновременной адсорбции смеси антител на НЧЗ происходит конкуренция за ограниченную площадь поверхности. Для количественной оценки содержания антител одной специфичности на поверхности НЧЗ исходили из количества добавленных антител и сорбционной емкости. Экспериментально установлено, что адсорбция 30-35 антител на поверхность одной НЧЗ (диаметр – $18,6 \pm 3,8$ нм) стабилизирует конъюгат. Флокуляционные кривые для антител разной специфичности представлены на рис. 24.

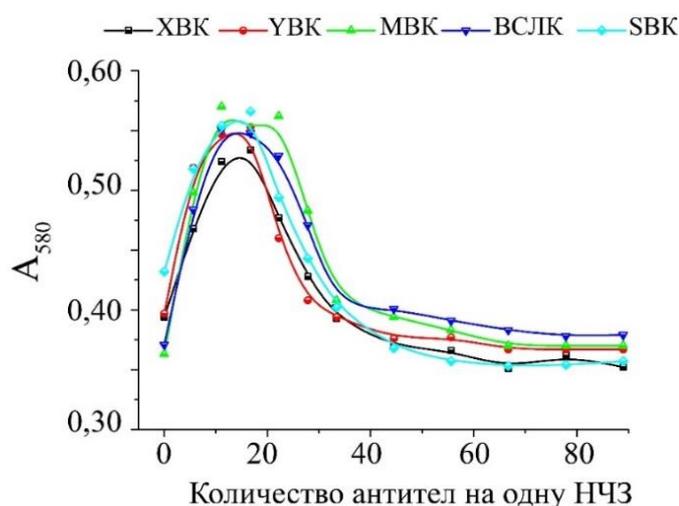


Рис. 24. Флокуляционные кривые для НЧЗ при добавлении антител разной специфичности в пересчете на количество молекул

Выбранные условия иммобилизации смеси антител позволяют обеспечить равные условия для адсорбции антител различной специфичности на поверхность НЧЗ и, как следствие, получить конъюгат, содержащий антитела, специфичные к пяти вирусам. Расчетное количество молекул антител индивидуальной специфичности на единичной НЧЗ составляет 10-15 штук.

3.2.3. Характеристика конъюгатов наночастиц золота методом асимметричного фракционирования в поле поперечных сил

Метод асимметричного фракционирования в поле поперечных сил (АФПП) позволяет проводить разделение и характеристику компонентов в сложных системах в соответствии с их гидродинамическими параметрами [209]. Метод АФПП был использован для исследования агрегационной устойчивости высококонцентрированных НЧЗ – Ат и смеси восьми препаратов НЧЗ – Ат. Высококонцентрированными суспензиями могут считаться препараты, в которых соотношение общего объема частиц и объема дисперсии (ϕ) превышает 0,01 [210]. При фракционировании препаратов конъюгатов происходит концентрирование до ≈ 185 нМ ($A_{520} = 80$), что соответствует $\phi \approx 0,02$.

Результаты фракционирования (зависимость времени удерживания от аналитического сигнала при заданных скоростях потока – фрактограмма) отдельного конъюгата НЧЗ с пАт против Y^{NBK} и смеси восьми конъюгатов представлены на рис. 25.

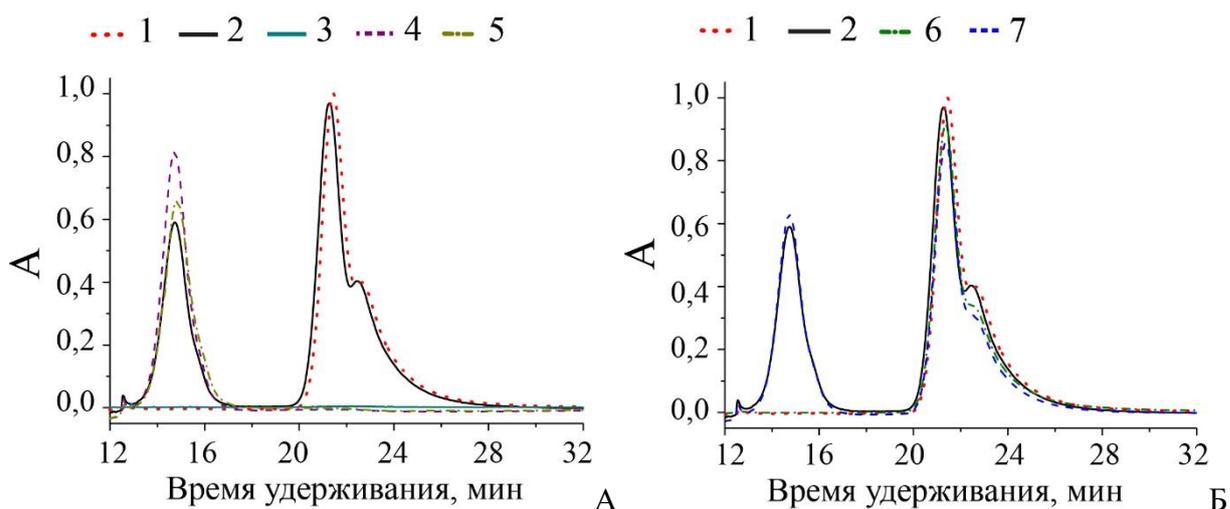


Рис. 25. Фрактограммы препаратов, полученные методом АФПП. А – НЧЗ – Ат против Y^{NBK} , регистрация при 520 нм (1) и 280 нм (2). Буфер для хранения конъюгата (тБСА), регистрация при 520 нм (3) и 280 нм (4). Раствор БСА (20 мкг), регистрация при 520 нм (5). Б – смесь восьми НЧЗ – Ат ($A_{520}=10$), регистрация при 520 нм (6) и 280 нм (7)

Полученные фрактограммы сходны и характеризуются наличием двух основных пиков с временами удерживания 13-17 и 20-28 минут. Для определения химической природы веществ, формирующих эти пики, использовали регистрацию при двух длинах волн – 280 нм (пик поглощения белка) и 520 нм (пик поглощения НЧЗ).

Первый пик характеризуется поглощением при 280 нм (рис. 25, А, кривая 2) и отсутствием сигнала при 520 нм (рис. 25, А, кривая 1). Было выдвинуто предположение, что данный пик соответствует БСА, присутствующему в препарате НЧЗ – Ат. Для

подтверждения методом АФПП фракционировали раствор ттБСА с регистрацией сигнала при 280 и 520 нм. Соответствие первых пиков на кривых 2, 4 и 5 по времени удерживания подтверждает соответствие первого пика в препарате конъюгата НЧЗ свободному БСА. Отметим, что при длине волны 520 нм БСА не регистрируется (рис. 25, А, кривая 3).

Второй пик характеризуется поглощением как при 280 (рис. 25, А, кривая 2), так и при 520 нм (рис. 25, А, кривая 1). Поглощение при 520 нм является характерным для НЧЗ с диаметром около 20, а поглощение при 280 нм свидетельствует о наличии связанных с поверхностью НЧЗ белковых молекул (антител и БСА). Таким образом, второй пик соответствует НЧЗ – Ат.

На рис. 25, Б представлено сравнение результатов фракционирования индивидуального и смеси восьми конъюгатов НЧЗ, анализируемых в равных объемах и концентрациях. Фрактограммы имеют одинаковое время удерживания и величину регистрируемого сигнала. Из полученных данных можно сделать вывод об отсутствии агрегации в высококонцентрированной смеси конъюгатов.

Размеры частиц обеих фракций определяли в потоке после фракционирования методом ДЛСР. Исследовали индивидуальный препарат НЧЗ – Ат против Y^{NBK} ($A_{520} = 10$), смесь восьми конъюгатов НЧЗ с антителами разной специфичности ($A_{520} = 10$), буфер ттБСА и БСА (рис. 26).

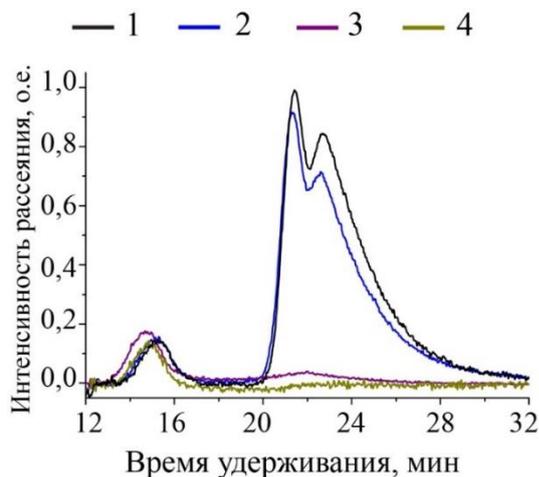


Рис. 26. Фрактограмма препаратов, полученная методом АФПП. Регистрация по интенсивности рассеяния. НЧЗ – Ат против Y^{NBK} , $A_{520} = 10$ (1). Смесь восьми НЧЗ – Ат, $A_{520}=10$ (2), буфер ттБСА (3). БСА, 20 мкг (4)

Показано присутствие в препаратах конъюгатов двух фракций – время удерживания 20-22 минуты и 22-24 минуты, которое наблюдается для всех НЧЗ – Ат и не зависит от концентрации конъюгата (рис. 26). Два пика отражают наличие в препарате популяций

частиц с разными размерами, что может быть связано с различной ориентацией адсорбированных антител и их полислойной адсорбцией [211]. Методом ДЛСР показано отсутствие крупнодисперсных агрегатов в высококонцентрированной смеси восьми конъюгатов ($A_{520}=80$). Значение D_h находится в пределах 25-60 нм (рис. 27).

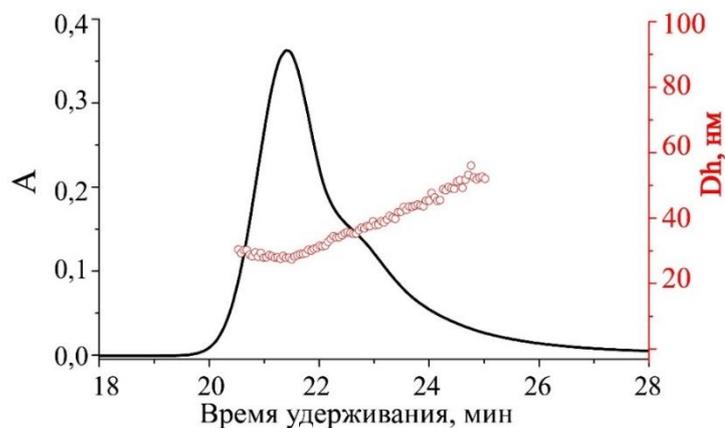


Рис. 27. Фрактограмма смеси восьми препаратов НЧЗ – Ат с регистрацией по поглощению на длине волны 280 нм и характеристикой гидродинамических диаметров фракционированных частиц

Полученные результаты подтверждают, что высококонцентрированные препараты индивидуальных НЧЗ – Ат и их смеси не формируют агрегатов. Электростатические силы отталкивания и наличие адсорбированных на поверхности белков препятствуют агрегации частиц в высококонцентрированных растворах в условиях, сходных с молекулярным краудингом (концентрация антител ≈ 1 мг/мл, более 10^{13} НЧЗ в мл). Как было показано в разделе 3.2.2 (рис. 23), адсорбция антител приводит к снижению поверхностного заряда частиц. Следовательно, основным стабилизирующим фактором для конъюгатов является присутствие высокомолекулярных белков-стабилизаторов на поверхности частиц. Полученные данные подтверждают возможность использования конъюгатов НЧЗ с высокой оптической плотностью для ИХА.

3.2.4. Характеристика магнитных частиц

В качестве маркера в работе также был использован коммерчески доступный препарат МЧ (Magsphere, США), состоящий из наночастиц оксида железа, стабилизированных включением в полимерную оболочку с функциональными карбоксильными группами для ковалентной иммобилизации антител.

Для определения размера и морфологии частиц, а также визуализации электронно - плотных включений частиц оксида железа в полимерную матрицу использовали метод ПЭМ.

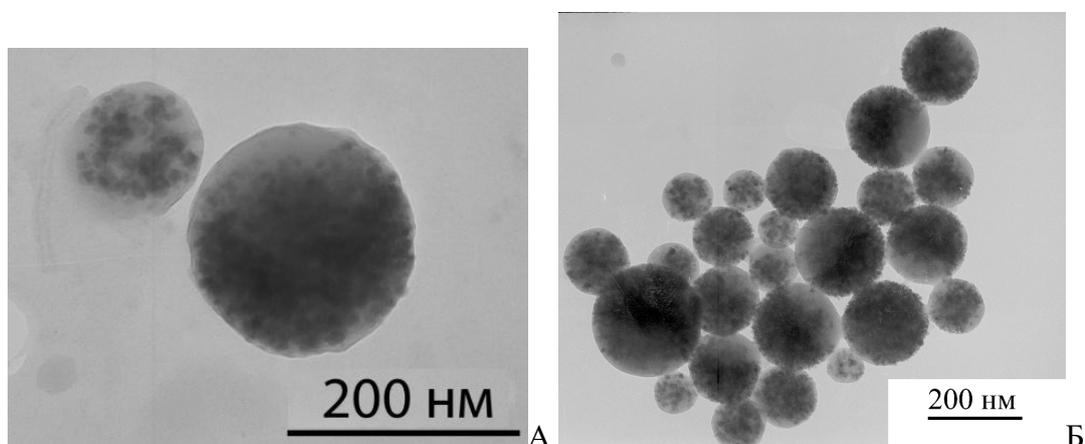


Рис. 28. Микрофотографии МЧ, полученные методом ПЭМ. А, Б магнитные частицы. Темные включения в полимерной матрице являются наночастицами оксида железа

На рис. 28, А наглядно показана структура МЧ – электронно-плотные структуры (частицы оксида железа) включены в полимерную матрицу. На рис. 28, Б показано присутствие в препарате МЧ разного размера. Таким образом, МЧ представляют собой высоко-гетерогенные субмикронные структуры с размером более 100 нм, состоящие из наночастиц оксида железа, включенных в полимерную матрицу.

3.2.5. Синтез и характеристика конъюгатов магнитных частиц

Для синтеза конъюгатов МЧ с антителами был использован карбодиимидный метод, основанный на активации карбоксильных групп на поверхности МЧ и формировании амидных связей с аминогруппами антител. Были синтезированы конъюгаты МЧ с мАт и их биотилированными производными к ХВК. Эффективность конъюгации определяли по количеству белка, связанного с МЧ. Оценка количества связанных с МЧ антител была основана на измерении концентрации антител в супернатанте (не связавшихся с МЧ при конъюгации) и определении разницы между исходно добавленными и несвязавшимися антителами. При добавлении 120 мкг антител на стадии конъюгации в супернатанте обнаруживается 7,9 мкг несвязанных антител. Таким образом, степень связывания при ковалентной иммобилизации составляет 93,4%. Расчетное количество молекул антител на единичную магнитную частицу составляет $2,5 \times 10^7$.

Полученные конъюгаты МЧ были исследованы методом ПЭМ (рис. 29).

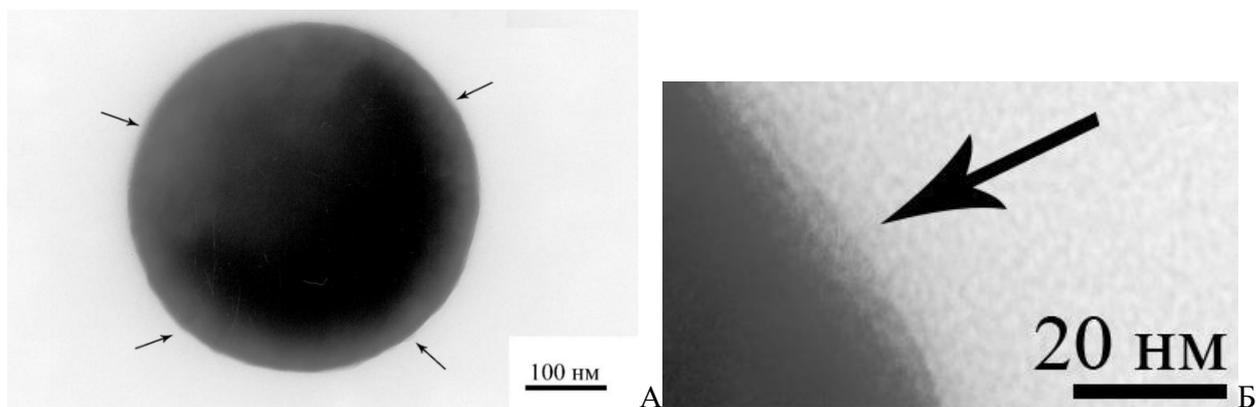


Рис. 29. Микрофотографии конъюгатов МЧ с антителами, полученные методом ПЭМ. А, Б – микрофотографии частицы конъюгата МЧ. Стрелками обозначены электронно-неплотные участки вокруг МЧ, соответствующие полимерной оболочке и слою иммобилизованных антител.

Показано отсутствие перекрестных сшивок между частицами и агрегатов в препаратах конъюгатов. Полученные результаты подтверждают иммобилизацию антител на поверхности МЧ.

Проведены синтез и характеристика наночастиц золота и их конъюгатов с моноклональными и поликлональными антителами к фитопатогенам вирусной и бактериальной природы, комплексов антивидовых антител с щелочной фосфатазой, стрептавидином, белком А. Получен конъюгат, содержащий на поверхности частиц пять антител различной специфичности к основным вирусным патогенам картофеля. Оптимизированы условия адсорбции биомолекул на поверхность наночастиц золота, обеспечивающие формирование стабильных конъюгатов. С использованием карбодиимидного метода синтезированы конъюгаты магнитных частиц с антителами. Показана высокая стабильность высококонцентрированных конъюгатов наночастиц золота с поликлональными антителами. Полученные данные являются основой для разработки экспрессных тест-систем и различных подходов для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа.

3.3. Разработка иммунохроматографического анализа фитопатогенов

Раздел посвящен разработке экспрессных иммунохроматографических тест-систем для определения вирусных (ХВК, УВК, ВСЛК) и бактериальных (*R. solanacearum*, *D. solani*, *C. michiganensis*) патогенов картофеля с использованием охарактеризованных антител и их конъюгатов с НЧЗ. Оптимизация условий анализа для достижения наименьшего ПО была

проведена для всех использованных в работе фитопатогенов. Детальное описание оптимизации ИХА представлено ниже на примере *R. solanacearum*. Условия, обеспечивающие наименьший предел обнаружения для других патогенов, представлены в разделе 3.3.6.

3.3.1. Концентрация антител при синтезе конъюгата

Концентрация антител при синтезе конъюгата определяет плотность адсорбционной посадки на поверхность НЧЗ и, как следствие, кинетические константы иммунных взаимодействий [205] и предел обнаружения ИХА. На примере пАт против *R. solanacearum* установлено, что минимальная стабилизирующая концентрация составляет 10 мкг/мл (НЧЗ с диаметром около 20 нм). Для исследования влияния концентрации иммобилизуемых антител на интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне были синтезированы три конъюгата НЧЗ с различной концентрацией антител – 8 мкг/мл (на 20% меньше минимальной стабилизирующей концентрации), 13 мкг/мл (на 30% больше минимальной стабилизирующей концентрации) и 16 мкг/мл (на 60% больше минимальной стабилизирующей концентрации). Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций *R. solanacearum* при различных концентрациях антител при синтезе конъюгата представлены на рис. 30.

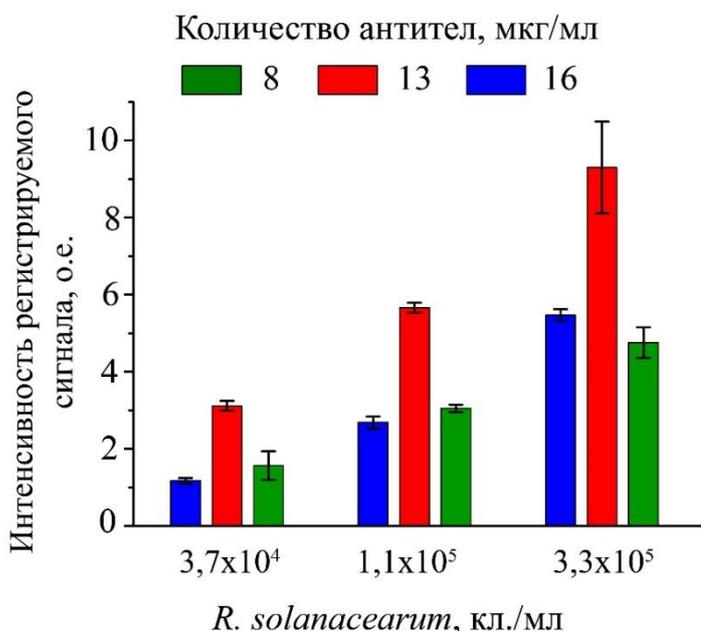


Рис. 30. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов от концентраций *R. solanacearum* в ИХА с конъюгатами НЧЗ, полученными при разных концентрациях антител. n = 3

Полученные результаты свидетельствуют о немонотонной зависимости интенсивности сигнала в тестовой зоне от концентрации антител при конъюгации. Наибольшая интенсивность сигнала наблюдается для конъюгата НЧЗ с антителами в концентрации 13 мкг/мл. При бóльших концентрациях возможна полислойная адсорбция антител на НЧЗ. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии количества антител при синтезе конъюгата на аналитические характеристики ИХА. В работе Safenkova и соавт. [23] показано, что для «сэндвич» ИХА повышение концентрации иммобилизуемых антител в 2 раза по сравнению с минимальной стабилизирующей концентрацией приводило к росту интенсивности окрашивания тестовой зоны. Дальнейшее увеличение концентрации адсорбируемых антител (до 900% относительно минимальной стабилизирующей концентрации) не приводило к существенным изменениям регистрируемого сигнала. Данный эффект был показан с использованием НЧЗ с размерами 23,4 нм, 33,4 и 52 нм и в широком диапазоне концентраций X вируса картофеля – от 1,5 до 300 нг/мл. В работе Vuzova и соавт. [205] было показано, что наибольшая интенсивность регистрируемого сигнала наблюдалась для конъюгатов мАт (на 85% меньше минимальной стабилизирующей концентрации) и 6 мкг/мл (соответствует минимальной стабилизирующей концентрации) для пАт (диаметр НЧЗ – $25,3 \pm 4,6$ нм). Дальнейшее повышение концентрации мАт на стадии иммобилизации (до 15-20 мкг/мл) приводило к снижению интенсивности регистрируемого сигнала, для пАт такой зависимости не наблюдалось.

Следует отметить, что на основании литературных данных выбор концентрации антител для адсорбции на НЧЗ невозможен. Концентрация антител зависит от ряда факторов, включая класс и подкласс иммуноглобулинов, особенностей препарата НЧЗ и др. Поэтому для каждого пула реагентов для ИХА эту величину следует определять индивидуально.

3.3.2. Оптимизация рабочей мембраны тест-полоски

Скорость миграции жидкости определяет время взаимодействия иммунореагентов и, как следствие, ПО анализа. Одним из основных параметров, влияющих на скорость миграции пробы, является средний размер пор мембраны. Чем меньше размер пор, тем медленнее движение жидкости вдоль тест-полоски. Снижение скорости миграции пробы приводит к увеличению времени взаимодействия иммунореагентов в потоке и позволяет нивелировать низкую скорость образования иммунных комплексов при использовании антител с невысокой константой скорости ассоциации. С другой стороны, использование мембран с мелкими порами ограничено для крупных корпускулярных антигенов, а также проб с высокой вязкостью (например, кровь или некоторые пищевые матрицы). Выбор

оптимальной мембраны основан на сочетании наибольшей интенсивности сигнала в тестовой зоне и минимального фона.

В работе были использованы мембраны (размер пор от 8 до 12 мкм), отличающиеся по скорости миграции потока (табл. 7). Проведена оценка влияния среднего времени миграции жидкости на интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне (рис. 31).

Табл. 7. Характеристики использованных в работе мембран

Мембрана	Среднее время миграции жидкости*, сек/4 см	Средний размер пор*, мкм
CNPH-200	200±30	≤8
CNPF-8	185±25	8
CNPC-10	140±28	10
CNPF-10	125±25	10
CNPC-12	120±28	12

* по данным производителя

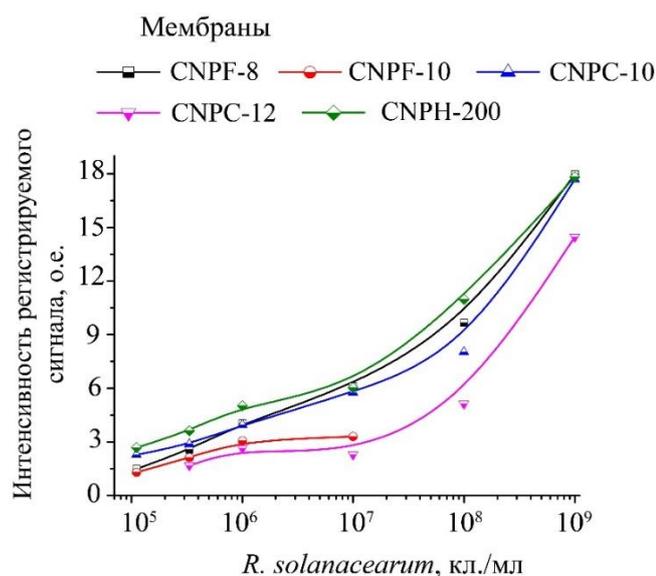


Рис. 31. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от типа рабочей мембраны при разных концентрациях *R. solanacearum*

Лимитирующим фактором использования мелкопористых мембран является высокий фон из-за адсорбции крупных корпускулярных антигенов (бактериальных клеток). Наибольшую интенсивность сигнала показывают мембраны CNPH-200, CNPC-10 и CNPF-8. Таким образом, чем больше среднее время миграции пробы по мембране, тем выше интенсивность окрашивания тестовой зоны. Для дальнейших экспериментов использовали рабочую мембрану CNPH-200.

3.3.3. Концентрация антител в тестовой зоне

Концентрация антител в тестовой зоне определяет количество молекул, способных формировать тройные иммунные комплексы (иммобилизованные антитела – антиген – НЧЗ – Ат). В «сэндвич» формате ИХА чем выше концентрация антител в тестовой зоне, тем сильнее равновесие реакции ассоциации сдвинуто в сторону образования иммунных комплексов [36]. Однако количество иммобилизованных антител ограничено сорбционной емкостью нитроцеллюлозных мембран. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций иммобилизованных на мембране антител представлены на рис. 32.

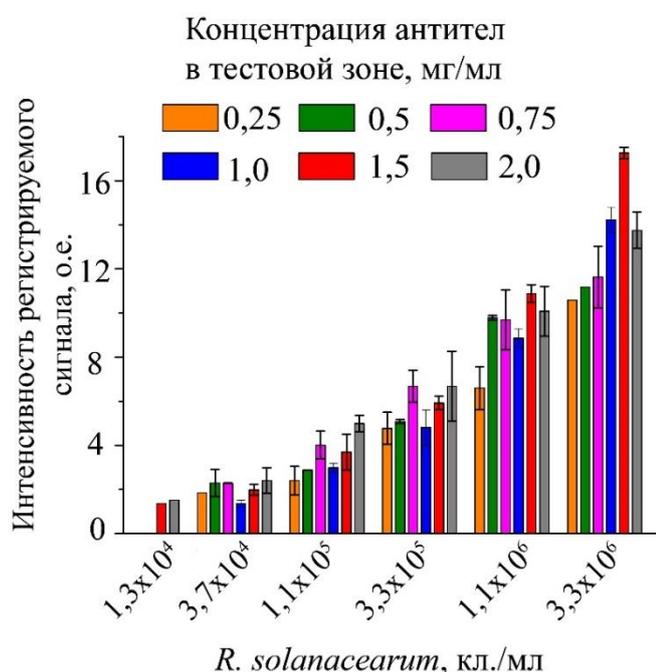


Рис. 32. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации иммобилизованных антител при разных концентрациях *R. solanacearum* ($A_{520}=5,0$). $n = 3$

При снижении концентрации клеток до $1,3 \times 10^4$ кл./мл только тест-полоски с антителами, нанесенными из растворов с концентрацией 1,5 и 2 мг/мл, демонстрировали окрашивание. Интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне при концентрации $1,3 \times 10^4$ кл./мл для 1,5 и 2 мг/мл антител оказывается достоверно не отличимой, поэтому при разработке ИХА для иммобилизации в тестовой зоне использовали раствор антител с концентрацией 1,5 мг/мл.

3.3.4. Количество конъюгата

При недостатке НЧЗ – Ат происходит формирование малого количества двойных иммунных комплексов (антиген – НЧЗ – Ат) и, как следствие, низкая интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне, ограничивающая ПО анализа [23]. В работе исследовали влияние количества конъюгата НЧЗ – Ат на интенсивность сигнала в тестовой зоне. Для этого на стекловолоконную мембрану наносили НЧЗ – Ат с A_{520} от 3 до 7. Полученные зависимости интенсивности регистрируемых сигналов от количества конъюгата при разных концентрациях клеток представлены на рис. 33.

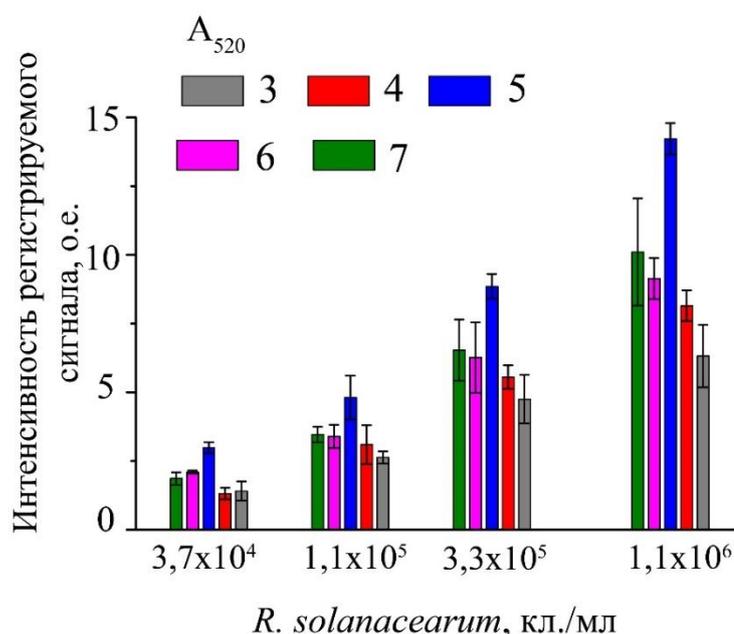


Рис. 33. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от значения A_{520} для НЧЗ – Ат при различных концентрациях *R. solanacearum*. $n = 3$

При изменении A_{520} от 3 до 5 наблюдается увеличение интенсивности регистрируемого сигнала. Дальнейшее повышение A_{520} до 7 приводит к снижению сигнала. При избытке конъюгата происходит блокирование эпитопов на поверхности антигена, что приводит к затруднению связывания иммунных комплексов в тестовой зоне.

Для достижения наибольшей интенсивности окрашивания в тестовой зоне использовали конъюгат с оптической плотностью $A_{520}=5$.

3.3.5. Влияние компонентов матрикса

Для определения влияния матрикса клубней картофеля на характеристики анализа проводили сравнение ПО, величин фона и времени ИХА в буфере и в экстракте. Внешний

вид тест-полосок представлен на рис. 34, количественные данные регистрации сигнала в тестовой зоне на рис. 35.

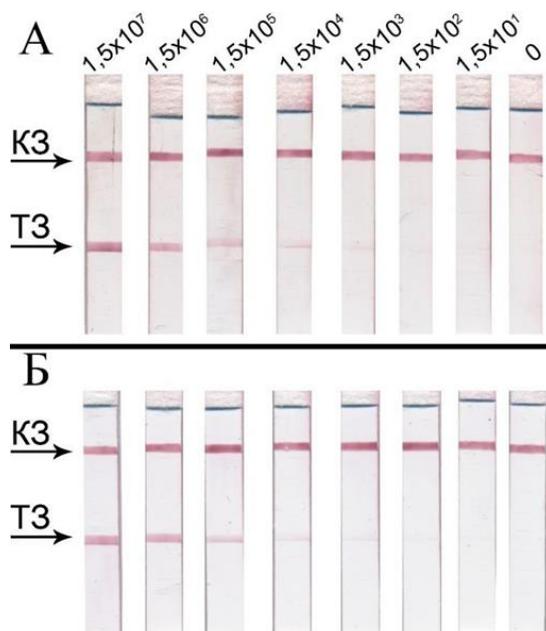


Рис. 34. Внешний вид тест-полосок после ИХА. А – в экстракте клубней картофеля. Б – в буфере (ФБС-Т). Концентрация клеток *R. solanacearum* указана над тест-полосками. КЗ – контрольная зона. ТЗ – тестовая зона

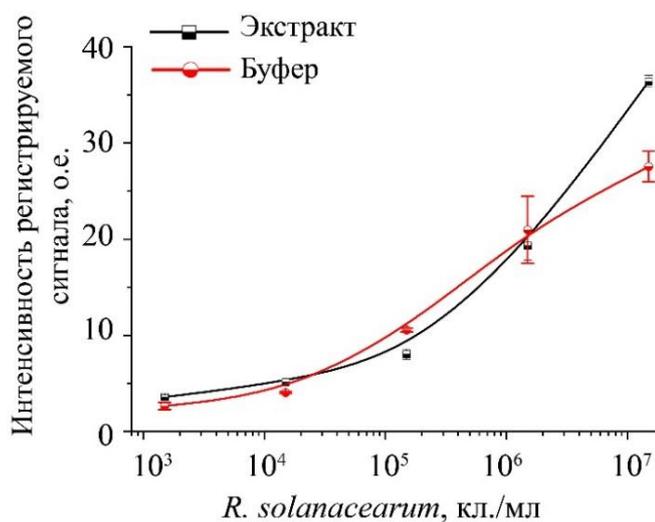


Рис. 35. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах для ИХА *R. solanacearum* при анализе в буфере и экстракте клубней картофеля. $n = 3$

Экстракт клубней картофеля не оказывает влияния на величину фона и скорость движения конъюгата по тест-полоске (рис. 34). Время ИХА в экстракте и в буфере составляет 10 мин. Компоненты матрикса также не влияют на интенсивность

регистрируемого сигнала в тестовой зоне и предел обнаружения ИХА. Предел обнаружения *R. solanacearum* составляет 2×10^3 кл./мл (рис. 35). Дальнейшее снижение предела обнаружения ИХА является актуальной задачей в связи с необходимостью контроля латентных инфекций.

3.3.6. Оптимальные условия иммунохроматографического анализа фитопатогенов

Эксперименты по оптимизации типа мембранного носителя, концентрации адсорбируемых в тестовую зону антител и количества конъюгата НЧЗ – Ат были проведены для использованных в работе фитопатогенов вирусной (ХВК, Y^{НВК}, ВСЛК) и бактериальной природы (*D. solani*, *C. michiganensis*, *R. solanacearum*). Выбранные условия ИХА (табл. 8) позволяют достичь минимальных пределов обнаружения анализа – ХВК (5 нг/мл), Y^{НВК} (12 нг/мл), ВСЛК (3 нг/мл), *R. solanacearum* (2×10^3 кл./мл), *D. solani* и *C. michiganensis* (10^4 кл./мл).

Табл. 8. Условия, обеспечивающие наименьший предел обнаружения ИХА фитопатогенов

Фитопатоген	ХВК	Y ^{НВК}	ВСЛК	<i>R. solanacearum</i>	<i>D. solani</i>	<i>C. michiganensis</i>
Концентрация антител при синтезе конъюгата, мкг/мл	14	15	12	13	13	13
Тип мембраны	CNPC-10	CNPC-10	CNPC-10	CNPH-200	CNPC-10	CNPC-10
Концентрация антител в тестовой зоне, мкг/мл	1	1	1	1,5	1	1
A ₅₂₀ НЧЗ – Ат	4	5	4	5	4	4

ПО всех разработанных ИХА соответствует требованиям нормативной документации, однако оказывается недостаточным для выявления скрытых инфекций или заражений на начальных этапах. В зависимости от условий хранения и культивирования в разных частях накапливается от 10 до 10^5 кл./мл [164]. Зараженные растения не имеют внешних признаков инфицирования [162]. Данные о количестве вирусных частиц при латентной инфекции картофеля в настоящее время отсутствуют. Имеются отдельные

публикации, показывающие предельно низкое количество вирусных частиц для развития инфекций. В работе Sacristan и соавт. [212] показано развитие инфекции табака с видимыми внешними симптомами при инокуляции 300 нг вируса табачной мозаики. Mouy и соавт. [213] установили, что тля (основное насекомое-распространитель Y вируса картофеля) способна передавать до 3 вирусных частиц и инициировать заражение растения. Использование посевного материала с латентной инфекцией для дальнейшего культивирования может привести к накоплению высоких количеств фитопатогена [214] и, как следствие, появлению видимых симптомов и существенным экономическим потерям [165]. Таким образом, выявление низких концентраций вирусов и бактерий является актуальной задачей [215].

3.4. Разработка подходов для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа фитопатогенов

В рамках данной работы предложены новые решения для снижения предела обнаружения ИХА фитопатогенов. В соответствии с предложенной классификацией (см раздел 1.3) реализованы схемы, основанные на:

- увеличении количества маркера за счет агрегации функционализированных золотых и магнитных частиц в тестовой зоне;
- каталитических свойствах маркера и накоплении продукта ферментативной реакции в тестовой зоне;
- формировании частиц с серебряной/золотой оболочкой за счет восстановления солей металлов на поверхности затравочных НЧЗ в тестовой зоне.

3.4.1. Методы, основанные на агрегации маркера

Для повышения интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне за счет увеличения размера маркера используют подходы, основанные на агрегации отдельных частиц [110], восстановлении прекурсоров и наращивании частиц [83]. НЧЗ размером более 40 нм не нашли широкого применения в ИХА из-за нестабильности и высокого неспецифичного сигнала [1]. Об использовании таких частиц в качестве маркеров сообщается в отдельных публикациях [216, 217]. В настоящей работе предложена схема, основанная на сборке в тестовой зоне агрегатов, состоящих из МЧ и НЧЗ. Для работы были получены конъюгаты МЧ с биотинилированными антителами к ХВК и НЧЗ со стрептавидином. Агрегация МЧ и НЧЗ основана на высокоспецифичном взаимодействии биотин-стрептавидин.

3.4.1.1. Характеристика агрегатов методом просвечивающей электронной микроскопии

Для исследования морфологии МЧ – НЧЗ использовали метод ПЭМ. Формирование агрегатов конъюгатов разного состава, представленных на рис. 36, происходит за счет высокоспецифичного и аффинного взаимодействия биотин-стрептавидин. При этом мелкие НЧЗ могут как перешивать МЧ (рис. 36 А), так и связываться на их поверхности. Мелкие НЧЗ ($\text{Ø} \approx 20 \text{ нм}$) способны перешивать не более двух МЧ ($\text{Ø} \approx 400 \text{ нм}$) (рис. 36 В), что исключает возможность формирования крупных агрегатов и их неспецифическую адсорбцию на пористых мембранах.

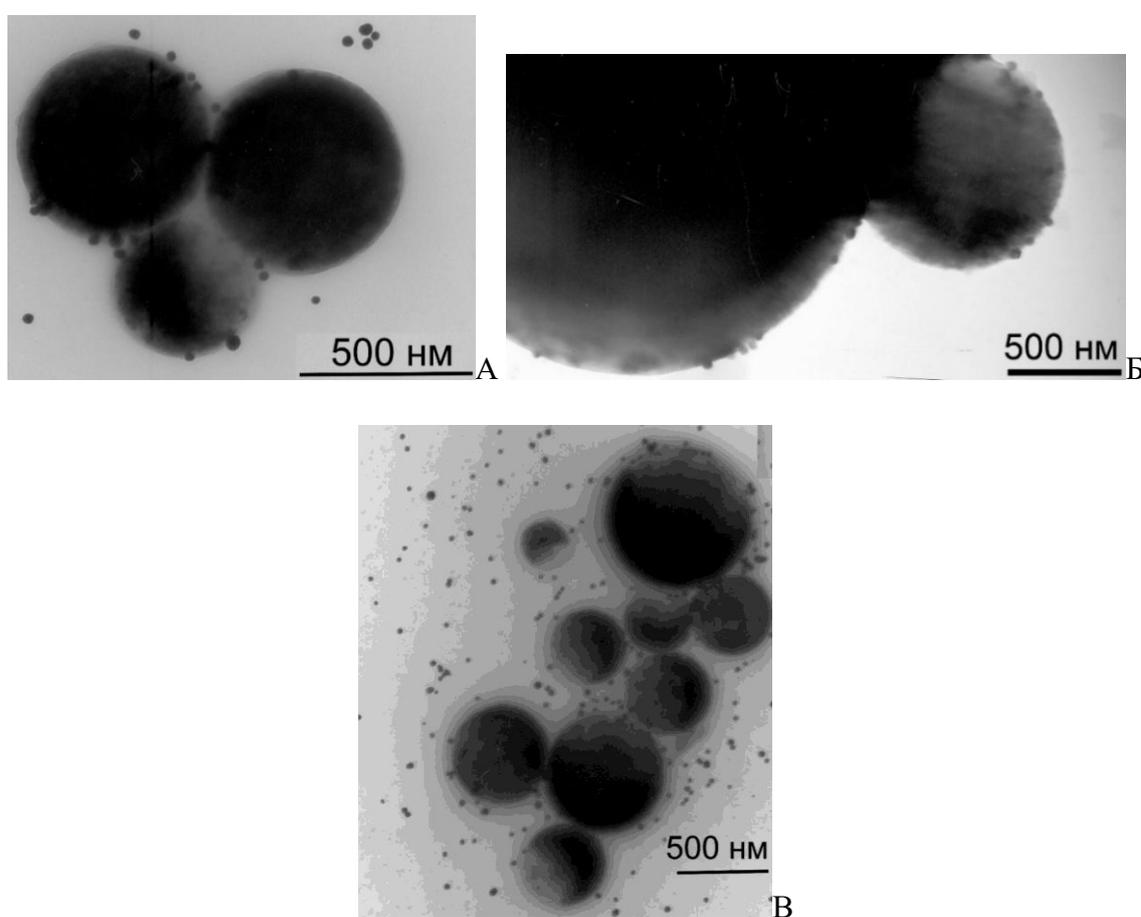


Рис. 36. Микрофотографии агрегатов МЧ – НЧЗ, полученные методом ПЭМ. А – Агрегация МЧ в результате взаимодействия с НЧЗ. Б – НЧЗ, связанные с поверхностью МЧ. В – Структура крупных агрегатов МЧ – НЧЗ

Биотинилированные антитела, специфичные к ХВК, после иммобилизации на поверхности МЧ сохраняли способность взаимодействовать не только со стрептавидином на поверхности НЧЗ, но и с ХВК в пробе. Методом ПЭМ успешно визуализировали комплексы МЧ – ХВК и НЧЗ – МЧ – ХВК (рис. 37).

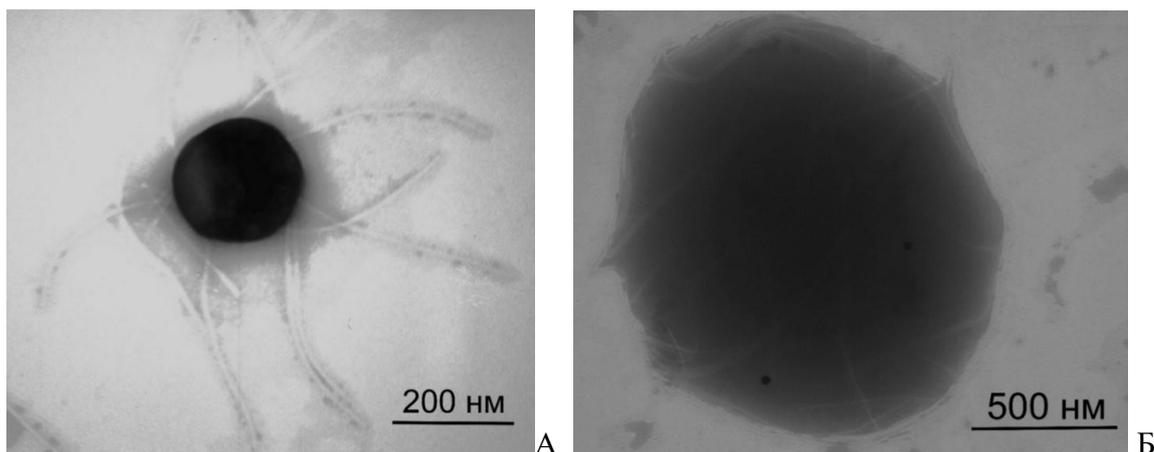


Рис. 37. Микрофотографии иммунных комплексов разного состава, полученные методом ПЭМ. А – МЧ – ХВК. Б – НЧЗ – МЧ – ХВК

Из рис. 37 видно, что одна частица конъюгата МЧ способна связывать множество вирионов. Предложенный нами подход приводит к формированию агрегатов НЧЗ – МЧ (рис. 36). Взаимодействие ХВК с конъюгатами МЧ (МЧ – ХВК, НЧЗ – МЧ – ХВК) подтверждает сохранение их антигенсвязывающей активности. Таким образом, предложенный способ формирования агрегатов позволяет увеличивать количество маркера (окрашенные НЧЗ и МЧ) в иммунных комплексах с ХВК и может использоваться для снижения предела обнаружения ИХА.

3.4.1.2. Иммунохроматографический анализ с агрегатами

Конъюгат МЧ с антителами, описанный в разделе 3.4.1.1, позволяет проводить магнитное концентрирование ХВК из пробы. Разработанный формат ИХА включает две стадии:

- инкубация конъюгата МЧ с пробой. Магнитное концентрирование ХВК (формирование комплексов ХВК – МЧ);
- Добавление конъюгата НЧЗ – стрептавидин к сконцентрированным комплексам ХВК – МЧ, агрегация МЧ – НЧЗ (формирование комплексов ХВК – МЧ – НЧЗ).

После этого тест-полоска погружается в анализируемую пробу, содержащую комплексы ХВК – МЧ – НЧЗ, которые мигрируют с фронтом жидкости и связываются в тестовой зоне с иммобилизованными антителами.

Для определения влияния каждой из стадий на предел обнаружения ИХА было использовано несколько форматов ИХА: с конъюгатом НЧЗ – Ат (рис. 38 А), с конъюгатом МЧ – антитела и магнитным концентрированием (рис. 38 Б), с агрегатами МЧ – НЧЗ без магнитного концентрирования (рис. 38 В), с агрегатами МЧ – НЧЗ и магнитным

концентрированием (рис. 38 Г). Сравнение аналитических характеристик для форматов, отображенных на рис. 38 А и Б (использование в качестве маркера конъюгата МЧ вместо НЧЗ), позволяет установить влияние природы маркера и магнитного концентрирования антигена на ПО. Сравнение аналитических характеристик для форматов, отображенных на рис. 38 Б и Г, позволяет установить влияние агрегации МЧ – НЧЗ на предел обнаружения.

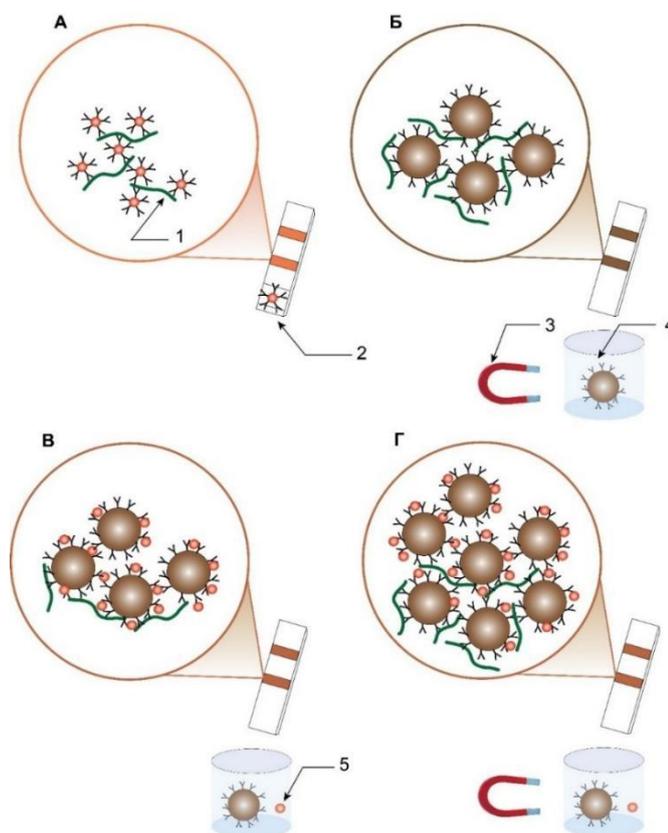


Рис. 38. Схемы ИХА со структурой формирующихся иммунных комплексов в тестовой зоне. А – классический ИХА с конъюгатом НЧЗ – Ат. Б – ИХА с конъюгатом МЧ и магнитным концентрированием. В – ИХА с конъюгатами НЧЗ – стрептавидин и МЧ – биотинилированные антитела. Г – ИХА с конъюгатами НЧЗ – стрептавидин и МЧ – биотинилированные антитела и магнитным концентрированием. 1 – ХВК; 2 – НЧЗ – Ат; 3 – магнит; 4 – конъюгат МЧ с биотинилированными антителами; 5 – конъюгат НЧЗ со стрептавидином

Предел обнаружения ИХА с НЧЗ (рис. 38, А) составил 8 нг/мл, что незначительно превышает предел обнаружения ИХА, описанного в разделе 3.3 (ИХА с НЧЗ – Ат, ПО – 5 нг/мл). Полученное отличие связано с использованием крупнопористой мембраны Millipore-75, выбранной для миграции крупных МЧ. Предел обнаружения ИХА с МЧ и магнитным концентрированием (рис. 38, Б) составил 4 нг/мл. Использование магнитного концентрирования и изменение природы детектируемого маркера позволило снизить ПО в 2 раза.

Предел обнаружения ИХА с агрегацией МЧ – НЧЗ без магнитного концентрирования (рис. 38, В) составил 4 нг/мл. Агрегация МЧ – НЧЗ снижает предел обнаружения в 2 раза по сравнению с классическим ИХА. Пределы обнаружения двух форматов ИХА (с МЧ и магнитным концентрированием (рис. 38, Б) и агрегацией МЧ – НЧЗ без магнитного концентрирования (рис. 38, В) оказались равными – 4 нг/мл. Однако подход, основанный на агрегации маркера, удобнее для практического применения, поскольку не требует дополнительных манипуляций и занимает меньше времени. Магнитное концентрирование позволяет увеличить содержание иммунных комплексов, а также удалить из пробы компоненты матрикса. В работе было использовано десятикратное магнитное концентрирование МЧ-ХВК из экстракта листьев картофеля. Далее в систему добавляли конъюгат НЧЗ и вносили тест-полоску (рис. 38 Г). Предел обнаружения ИХА с агрегацией МЧ-НЧЗ с магнитным концентрированием составил 0,25 нг/мл. Комбинация магнитного концентрирования и формирования гетероагрегатов МЧ – НЧЗ позволила снизить предел обнаружения в 32 раза по сравнению с классическим ИХА и в 16 раз – по сравнению с ИХА, когда эти подходы были использованы отдельно. Внешний вид тест-полосок и градуировочные зависимости показаны на рис. 39, пределы обнаружения - в табл. 9.

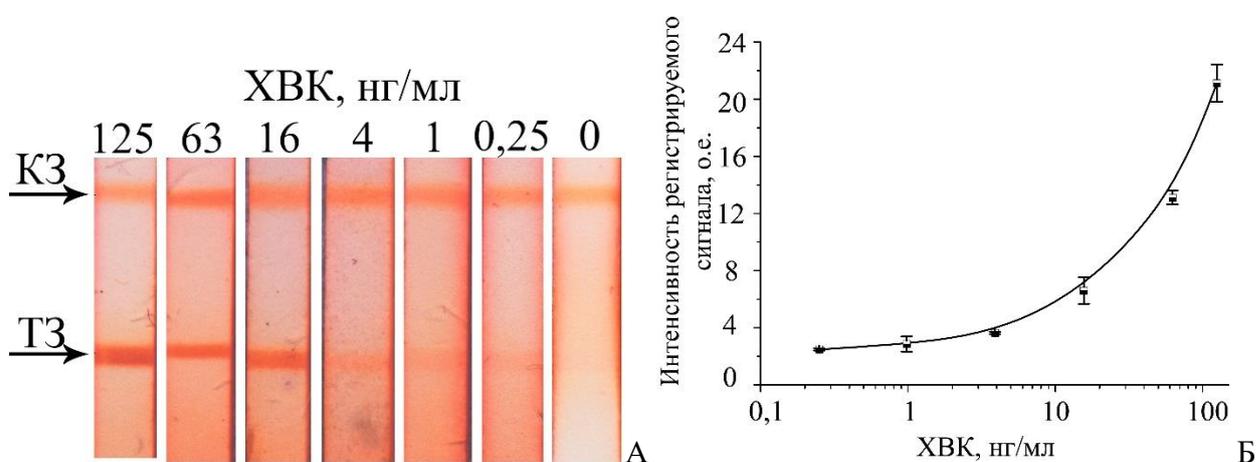


Рис. 39. ИХА с магнитным концентрированием и конъюгатом НЧЗ-стрептавидин. А – внешний вид тест-полосок. Б – зависимость интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне от концентрации ХВК в пробе. n = 3

Табл. 9. Сравнение пределов обнаружения различных форматов ИХА

Метод	Время анализа, мин	Предел обнаружения ХВК, нг/мл
ИХА с НЧЗ	10	8
ИХА с концентрированием МЧ	25	4

ИХА с агрегацией МЧ – НЧЗ без магнитного концентрирования	15	4
ИХА с агрегацией МЧ – НЧЗ с магнитным концентрированием	25	0,25

3.4.2. Ферментативная амплификация иммунохроматографического анализа

Пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза являются наиболее широко используемыми ферментами-маркерами в ИФА. Для их применения в ИХА необходимо минимизировать неспецифическое связывание ферментативной метки в тестовой зоне, исключив тем самым ложноположительные результаты анализа. Пероксидаза не может быть использована в ИХА фитопатогенов из-за высокой эндогенной активности растительных экстрактов [218]. Щелочная фосфатаза имеет меньшее распространение в растительных экстрактах и может быть использована для снижения предела обнаружения ИХА.

3.4.2.1. Форматы иммунохроматографического анализа с щелочной фосфатазой

Для проведения ферментативной амплификации в ИХА была использована ЩФ. Схема ИХА с использованием конъюгата НЧЗ и комплекса ЩФ – антивидовые антитела представлена на рис. 40.

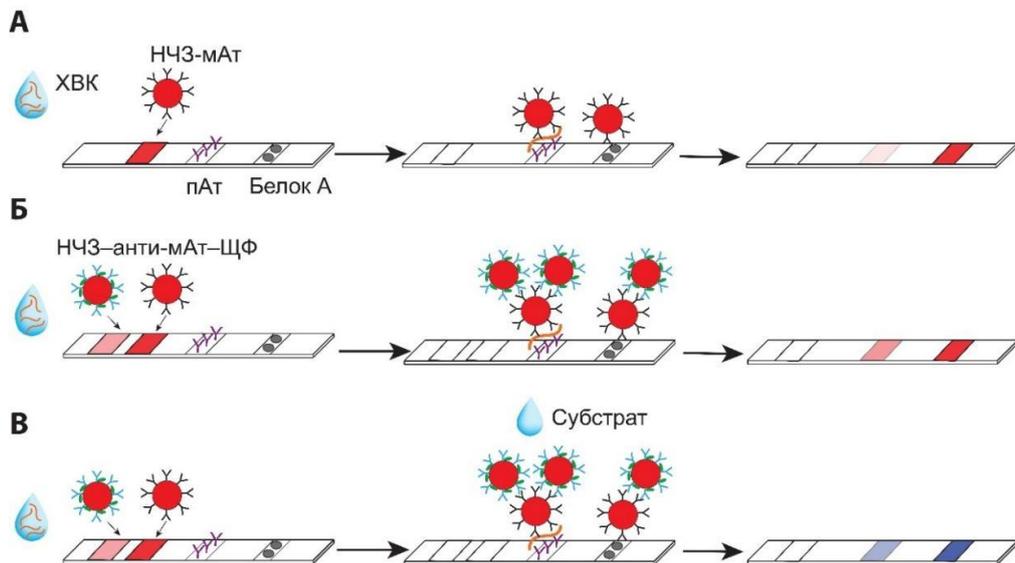


Рис. 40. Схемы ИХА. А – классический анализ с одним конъюгатом НЧЗ (ИХА 1). Б – введение дополнительного конъюгата с ЩФ, но без ферментативной амплификации (ИХА 2). В – введение дополнительного конъюгата с ЩФ и ферментативной амплификацией (ИХА 3)

Снижение ПО основано на регистрации окрашенных продуктов ферментативной реакции в тестовой зоне. Поскольку использованный в работе коммерческий конъюгат ЩФ с антивидовыми антителами является высокомолекулярным комплексом (молекулярная масса более 300 кДа), для его введения в систему использовали дополнительный конъюгат НЧЗ. Применение второго конъюгата как носителя ЩФ необходимо для увеличения количества адсорбированных молекул. При погружении тест-полоски в анализируемую жидкую пробу инициируется вымывание конъюгатов НЧЗ и их агрегация вследствие специфического взаимодействия антитела – антивидовые антитела.

Для определения эффективности каждой из стадий амплификации было использовано три формата ИХА.

Первый формат (рис. 40 А, ИХА 1) является классическим ИХА и основан на использовании конъюгата НЧЗ с антителами против ХВК (НЧЗ – мАт).

Второй формат (рис. 40 Б, ИХА 2) основан на использовании двух конъюгатов НЧЗ – мАт и НЧЗ – анти-мАт– ЩФ, специфично взаимодействующих друг с другом. В данном формате не используются ферментативные свойства ЩФ. Сравнение аналитических характеристик ИХА 1 и ИХА 2 позволяет установить вклад агрегации НЧЗ в тестовой зоне в снижение ПО.

Третий формат (рис. 40 В, ИХА 3) так же, как и ИХА-2, основан на взаимодействующих между собой конъюгатах НЧЗ – мАт и НЧЗ – анти-мАт – ЩФ, но включает ферментативную амплификацию сигнала. Сравнение аналитических характеристик ИХА 2 и ИХА 3 позволяет установить вклад амплификации сигнала ЩФ в снижение ПО.

3.4.2.2. Оптимизация условий иммунохроматографического анализа с щелочной фосфатазой

При взаимодействии двух конъюгатов (НЧЗ – мАт и НЧЗ – анти-мАт – ЩФ) эффект амплификации основан на формировании агрегатов и накоплении бóльших количеств маркера в тестовой зоне. Однако агрегация конъюгатов НЧЗ при неоптимизированных условиях может привести к неспецифическому связыванию в тестовой области и ложноположительному результату анализа. Поэтому для достижения минимального ПО оптимизировали количество конъюгатов. Для НЧЗ – мАт использовали ранее выбранное $A_{520}=4$ (табл. 8), а для конъюгата с ЩФ A_{520} варьировали (2; 1; 0,5; 0,4; 0,2). Повышение количества конъюгата НЧЗ – анти-мАт – ЩФ до $A_{520} = 2,0$ приводит к фоновому окрашиванию тестовой зоны для отрицательных проб из-за неспецифической адсорбции агрегатов на мембране. Максимальное значение A_{520} для НЧЗ – анти-мАт – ЩФ, при котором не происходит окрашивания тестовой зоны для отрицательных проб, равно 1,0.

Для достижения наибольшей ферментативной амплификации без фонового окрашивания использовали конъюгат с данной оптической плотностью.

Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ХВК для ИХА 1 и 2 представлены на рис.41.

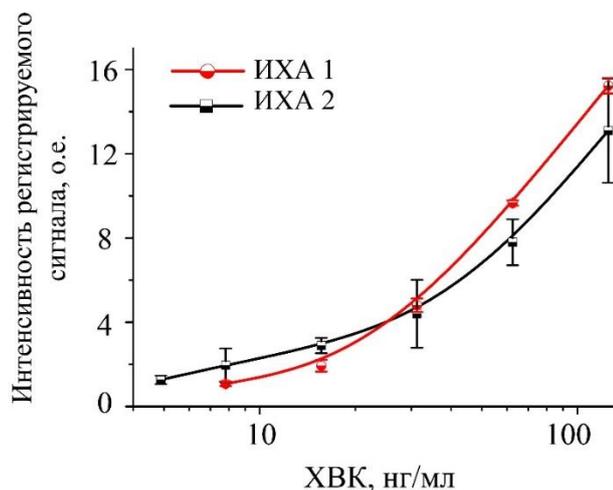


Рис. 41. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ХВК для ИХА 1 и 2. $n = 4$

Снижение ПО (с 8 до 5 нг/мл) обусловлено введением дополнительного конъюгата НЧЗ – анти-мАт – ЩФ и его взаимодействием с НЧЗ – Ат. Предложенная схема с введением ЩФ с использованием дополнительного конъюгата позволяет не только увеличить количество ферментной метки в иммунных комплексах, но и снизить ПО в 1,6 раза.

3.4.2.3. Оптимизация условий ферментативной амплификации

Наиболее широко используемыми субстратами ЩФ в иммуноанализе являются п-нитрофенил фосфат (в результате реакции происходит формирование желтоокрашенного растворимого продукта) и смесь нитросинего тетразолий хлорида (NBT) и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (BCIP) (формирование темноокрашенного нерастворимого продукта) [219]. В случае ИХА для амплификации сигнала на мембране предпочтительно использование BCIP + NBT, поскольку окрашенный продукт накапливается в тестовой и контрольной зонах и не диффундирует вдоль мембраны.

Для выбора оптимального субстрата проводили ИХА в буфере с добавлением 4 нг/мл ХВК. После анализа на влажную тест-полоску наносили 10 мкл субстратных растворов (п-нитрофенилфосфат или BCIP + NBT) и выдерживали в течение 2 минут. Как видно из рис. 42 А, растворимый продукт ферментативной реакции (нитрофенол) диффундирует из тестовой/контрольной зон вдоль тест-полоски. Нерастворимый продукт

реакции (диформаза) накапливается в тестовой/контрольной зонах и не диффундирует вдоль тест-полоски. Повышение интенсивности окраски наблюдается только в этих зонах (рис. 42 Б). Аккумуляция нерастворимого диформаза в тестовой и контрольной зонах приводит к изменению их окраски. Темноокрашенный продукт на светлом фоне нитроцеллюлозной мембраны является более контрастным по сравнению с НЧЗ, что обеспечивает удобство визуальной регистрации сигнала. Поэтому в качестве субстрата использовали ВСР + NBT.

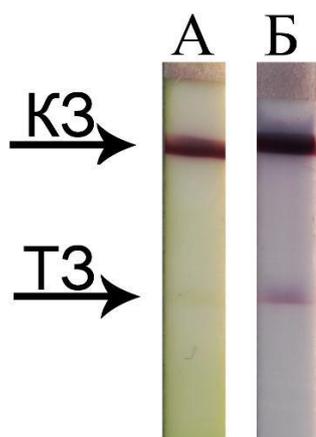


Рис. 42. Внешний вид тест-полосок после ИХА ХВК (4 нг/мл) и амплификации сигнала. А – с использованием п-нитрофенил фосфата. Б – с использованием ВСР + NBT

Для выбора оптимального времени инкубации субстрата проводили ИХА в буфере, содержащем 4 нг/мл ХВК. После анализа на влажную тест-полоску наносили 10 мкл ВСР + NBT и регистрировали рост интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне (рис. 43).

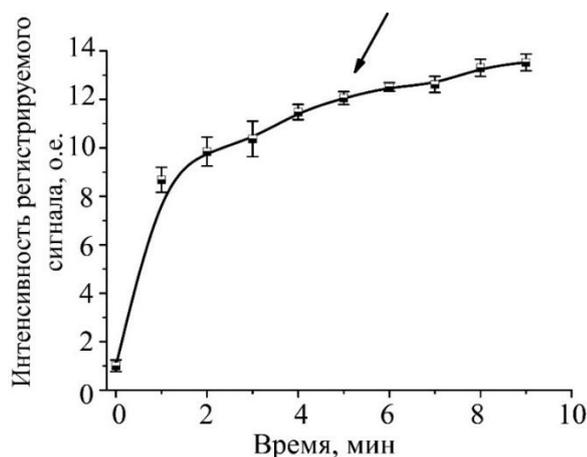


Рис. 43. Зависимость интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне от времени инкубации субстрата на тест-полоске. Выбранное время инкубации (5 мин) отмечено стрелкой. $n = 3$

Добавление субстрата приводит к резкому увеличению интенсивности сигнала (с 1 до 9 о.е., $\approx 70\%$ от максимальной интенсивности) в течение 3 минут. Дальнейшая инкубация (до 9 минут) приводит к незначительному росту регистрируемого сигнала (до 13 о.е.). В работе использовали пятиминутную инкубацию субстрата для достижения высокой амплификации сигнала (обеспечивает до 85% от максимально возможной интенсивности) за короткий промежуток времени.

3.4.2.4. Использование щелочной фосфатазы для высокочувствительного иммунохроматографического анализа

Далее проводили ИХА с ЩФ в буфере и в экстрактах листьев картофеля. Внешний вид тест-полосок до и после добавления субстрата показан на рис. 44. Зависимости интенсивностей сигналов в тестовых зонах при анализе в буфере и в экстракте представлены на рис. 45.

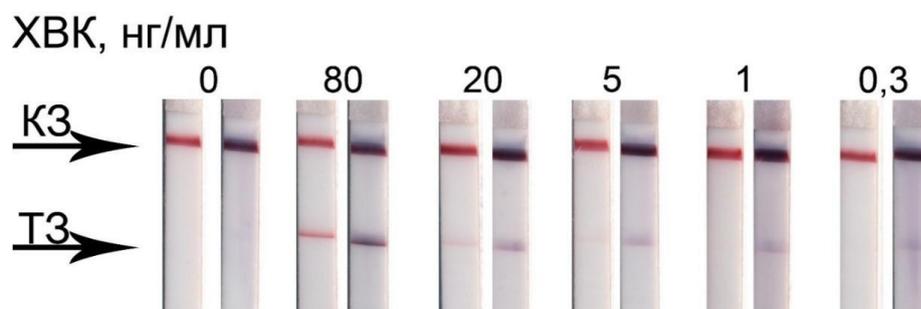


Рис. 44. Внешний вид тест-полосок до (слева) и после (справа) добавления ВСIP/NBT при различных концентрациях ХВК.

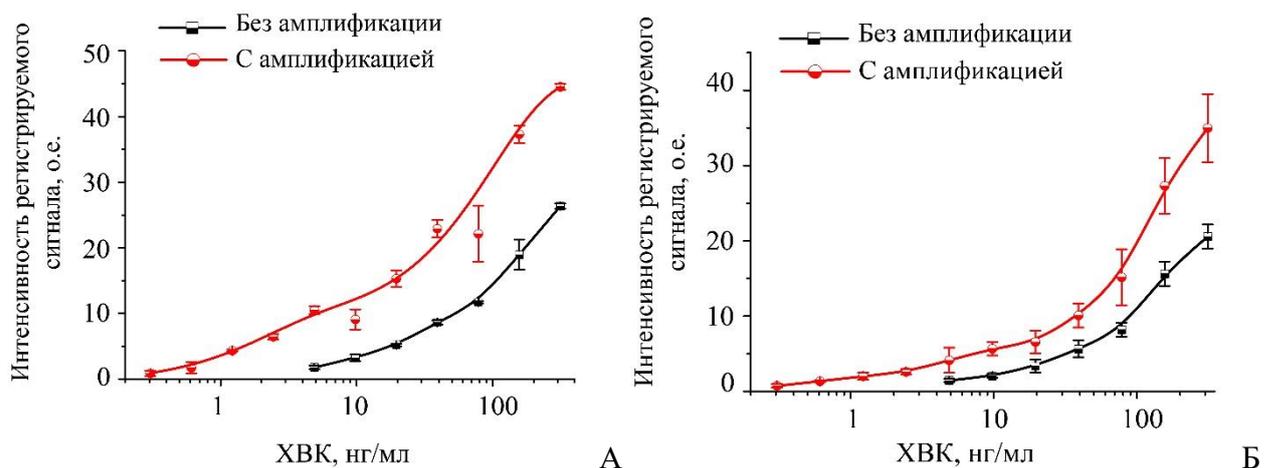
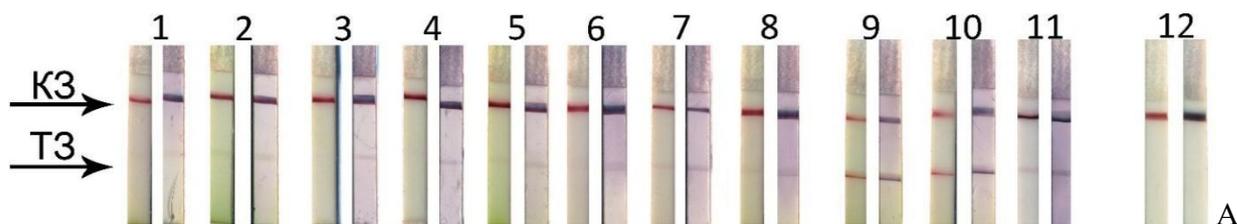


Рис. 45. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах без/с амплификацией сигнала: А – в буфере, Б – в экстракте листьев картофеля. $n = 5$

Использование ЩФ для амплификации сигнала позволило снизить ПО $\approx 16,6$ раз с 5 нг/мл для до 0,3 нг/мл как в буфере, так и в экстракте листьев картофеля (рис. 45 А, Б). По сравнению с ИХА с использованием НЧЗ (ИХА 1) предел обнаружения оказался ниже в ≈ 27 раз.

ИХА 2 и 3 были использованы для анализа зараженных ХВК листьев картофеля. Внешний вид тест-полосок до и после амплификации показан на рис. 46 А, интенсивности сигналов в тестовых зонах до и после амплификации ЩФ представлены на рис. 46 Б. В работе использовали 11 зараженных экстрактов с разными концентрациями ХВК (экстракты 1-11) и один здоровый (экстракт 12).



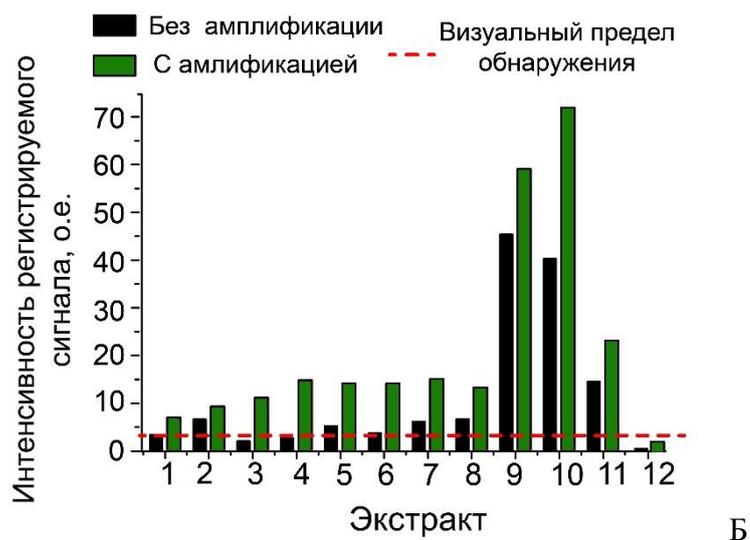


Рис. 46. Увеличение интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне для ИХА зараженных ХВК листьях картофеля. А – внешний вид тест без (слева) и с (справа) амплификацией сигнала. Над тест-полосками указан номер экстракта. Б – гистограмма интенсивности сигнала тестовой зоны без/с амплификацией сигнала с использованием ЩФ

Величина неспецифичного сигнала для ИХА здорового экстракта оказывается существенно ниже по сравнению с зараженными экстрактами (интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне $\approx 0,5$ о.е.) (тест-полоска 12). Увеличение интенсивности сигнала в тестовой зоне после амплификации ЩФ составило 30-400%. Для ИХА 2 экстрактов 1, 3, 4 и 6 содержание ХВК было ниже визуального предела обнаружения ИХА 2. Использование амплификации позволяет достоверно определять формирование окрашенной тестовой зоны визуально.

3.4.2.5. Сохранение ферментативных свойств конъюгата щелочной фосфатазы

Для использования разработанной тест-системы в реальных условиях необходима высокая стабильность компонентов во времени. В литературе нет данных о влиянии хранения на ферментативную активность конъюгатов НЧЗ с ЩФ. Для моделирования ускоренного старения конъюгаты НЧЗ – анти-мАт – ЩФ хранили в высушенном виде на стекловолоконной мембране при 45°C без осушителя (силикагеля). Для оценки ферментативной активности ВСIP + NBT добавляли на стекловолоконную мембрану к высушенному конъюгату НЧЗ – анти-мАт – ЩФ и спустя 2 минуты определяли интенсивность окрашивания. Полученные данные (рис. 47) показывают, что 85% ферментативной активности сохраняется в течение 90 дней хранения.

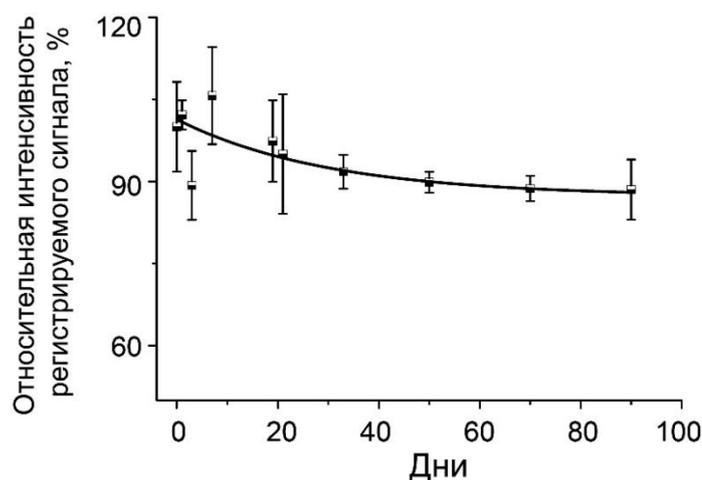


Рис. 47. Зависимость относительной интенсивности регистрируемого сигнала (в % от исходной) на мембране с конъюгатом НЧЗ – -анти-мАт – ЩФ при хранении в течение 90 дней в условиях ускоренного старения. $n = 2$

Разработанный подход для снижения предела обнаружения ИХА с использованием конъюгата НЧЗ – -анти-мАт – ЩФ прост в исполнении, не требует специальных навыков (пользователь добавляет только готовый субстратный раствор), занимает мало времени (ферментативная стадия анализа – пять минут). Таким образом, данный подход сохраняет все преимущества ИХА как внелабораторного метода анализа и позволяет снизить предел обнаружения в 27 раз, при времени анализа 15 минут.

3.4.3. Методы амплификации, основанные на увеличении размера маркера

Одним из основных параметров, определяющих интенсивность регистрируемого оптического сигнала НЧЗ, является их размер [21]. Для достижения наименьшего ПО необходимо использовать крупные НЧЗ. Однако низкая стабильность и плохая миграция в пористых нитроцеллюлозных мембранах ограничивают применение крупных частиц в качестве маркера [1]. В данном разделе предложены новые решения, позволяющие увеличить размер НЧЗ после проведения анализа. Восстановление солей серебра и золота (серебряное и золотое усиление, соответственно) на исходных небольших (около 20 нм) затравочных НЧЗ позволяют существенно увеличить размер маркера и интенсивность колориметрического сигнала метки и, как следствие, снизить ПО.

3.4.3.1. Оптимизация условий серебряного усиления для снижения предела обнаружения

Благодаря простоте выполнения и высокой амплификации сигнала метод серебряного усиления является перспективным для практического применения. Расширение спектра контролируемых антигенов для ИХА с серебряным усилением

остаётся актуальной задачей. В работе были применены четыре схемы введения реагентов для усиления (рис. 48).

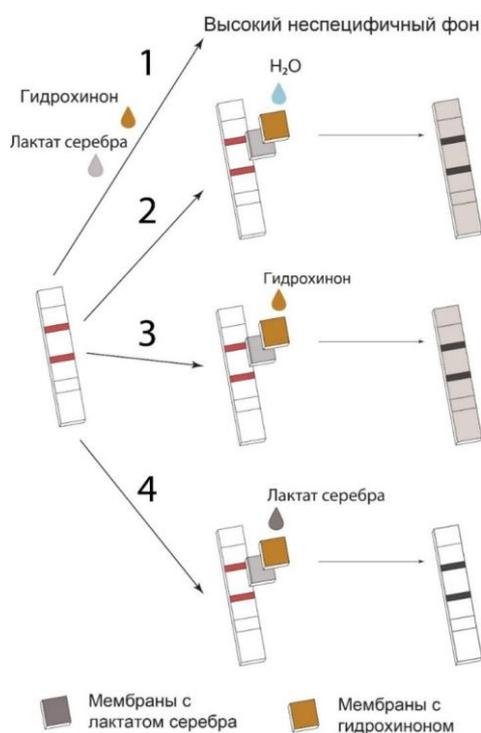


Рис. 48. Схемы введения лактата серебра и гидрохинона для проведения серебряного усиления ИХА

Прямой метод основан на смешивании растворов лактата серебра и гидрохинона и нанесении смеси на тест-полоску (рис. 48, 1). Непрямой способ введения основан на использовании дополнительных мембран. Лактат серебра и гидрохинон высушивали на отдельных стекловолоконных мембранах. Стекловолоконные мембраны накладывали на тестовую зону, для вымывания реагентов добавляли:

- воду (рис. 48, 2),
- гидрохинон (рис. 48, 3),
- лактат серебра (рис. 48, 4).

В литературе описаны различные схемы введения реагентов для серебряного усиления – смешивание и нанесение на тест-полоску [220], пропускание вдоль тест-полоски [81], предварительное нанесение и высушивание на мембранах-носителях [74]. Оптимальные схемы введения усиливающих реагентов для разных объектов отличаются и не могут быть унифицированы. Например, в работе Linages и соавт. [25] показано, что пропускание смеси нитрата серебра и гидрохинона вдоль тест-полоски не приводит к существенному фоновому окрашиванию. Бызова и соавт. [79] использовали для введения

усиливающих реагентов стекловолоконные мембраны, поскольку прямое нанесение реагентов приводило к высокому фону. Эффективность амплификации сигнала и появление фона определяются множеством параметров – размером НЧЗ [221], присутствием в пробе хлорид/фосфат ионов [74], неспецифическим связыванием конъюгатов НЧЗ, химической природой реагентов [75] и др. Поэтому в каждом конкретном случае необходим выбор схем введения усиливающих реагентов.

Метод серебряного усиления был использован для снижения ПО *R. solanacearum* и ВСЛК. Для оптимизации серебряного усиления варьировали соотношение реагентов и их схему введения. Для *R. solanacearum* подход 1 дает высокий фон по всей тест-полоске, не позволяющий достоверно регистрировать положение и окрашивание тестовой зоны. Подходы 2, 3 приводят к окрашиванию всей тест-полоски и затрудняют визуальную регистрацию результатов анализа. Подход 4 позволяет получить высококонтрастные темноокрашенные тестовые/контрольные зоны на светлом фоне мембраны с минимальным фоновым окрашиванием. Для ВСЛК наилучший результат показал подход 1.

Промывка тест-полосок водой до проведения серебряного усиления позволяет удалить хлорид и фосфат ионы (компонентов матрикса) и проводить усиление в растительных экстрактах. Для остановки реакции восстановления серебра на затравочных НЧЗ в работе был предложен подход, основанный на добавлении на тест-полоску растворов с высокой концентрацией хлорид ионов. Формирование малорастворимого хлорида серебра позволяет останавливать реакцию восстановления серебра в любой момент, исключить развитие фонового окрашивания при длительном выдерживании на тест-полоске и определять интенсивность окрашивания тестовой зоны после окончания анализа.

3.4.3.2. Использование серебряного усиления для снижения предела обнаружения *R. solanacearum*

ИХА с амплификацией сигнала методом серебряного усиления проводили в буфере и в экстрактах клубней картофеля. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах после анализа в буфере и в экстракте представлены на рис. 49 А и Б.

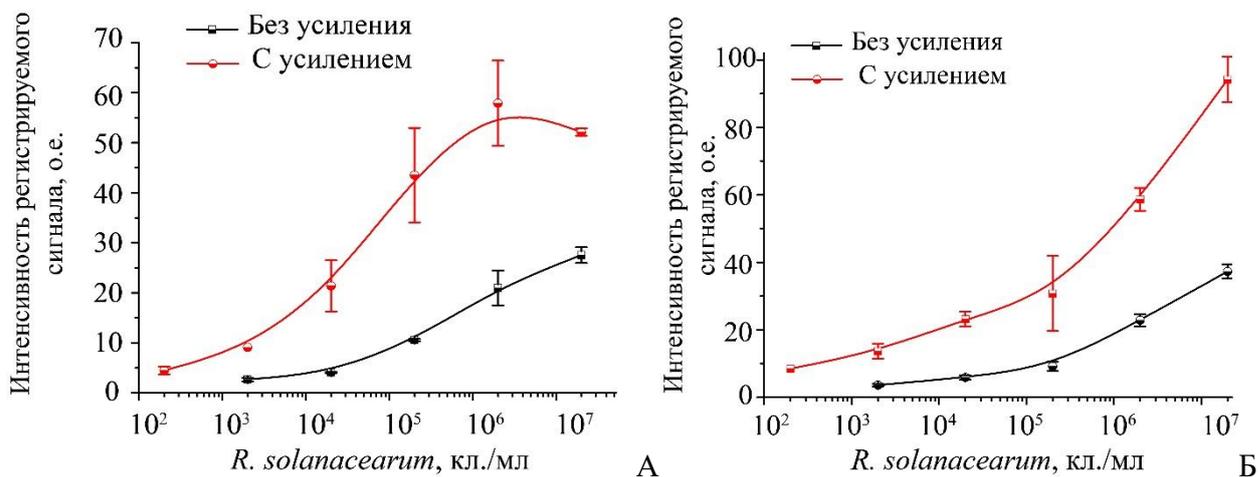


Рис. 49. Метод серебряного усиления в ИХА *R. solanacearum*. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций клеток, анализ в буфере (А) и в экстракте клубней картофеля (Б). n = 4

Метод серебряного усиления позволяет снизить предел обнаружения *R. solanacearum* в 10 раз до 200 кл./мл как в буфере (рис. 49, А), так и в экстракте (рис. 49, Б). Описанные в литературе методы ИФА имеют высокие пределы обнаружения – 10^3 - 10^6 КОЕ/мл (в зависимости от штамма) в клубневом экстракте [222] и 10^4 КОЕ/г в почве [223]. Имеются единичные публикации об использовании ИХА для определения *R. solanacearum*. В работе Li и соавт. [222] показано, что предел обнаружения коммерческих тест-полосок («Agdia», США) составляет около 10^5 КОЕ/мл. Методы, основанные на ПЦР, хотя и характеризуются меньшим пределом обнаружения (10^3 - 10^5 КОЕ/мл для ПЦР с электрофорезом в агарозном геле [222], 10^3 КОЕ/мл для цифрового ПЦР [224], 10^2 КОЕ/мл для ПЦР в реальном времени [225]), требуют использования дорогостоящего стационарного оборудования и реагентов и занимают много времени, поэтому не могут быть применены для определения *R. solanacearum* во внелабораторных условиях.

Таким образом, ПО разработанного ИХА с серебряным усилением позволяет диагностировать латентную инфекцию в клубнях картофеля. Общее время анализа, включая подготовку проб, не превышает 15 минут.

3.4.3.3. Снижение предела обнаружения для вируса скручивания листьев картофеля

Для определения ВСЛК основным объектом являются листья картофеля, накапливающие вирус в большей степени. Внешний вид тест-полосок до и после серебряного усиления показан на рис. 50. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций ВСЛК в экстракте до и после серебряного усиления представлены на рис. 51.

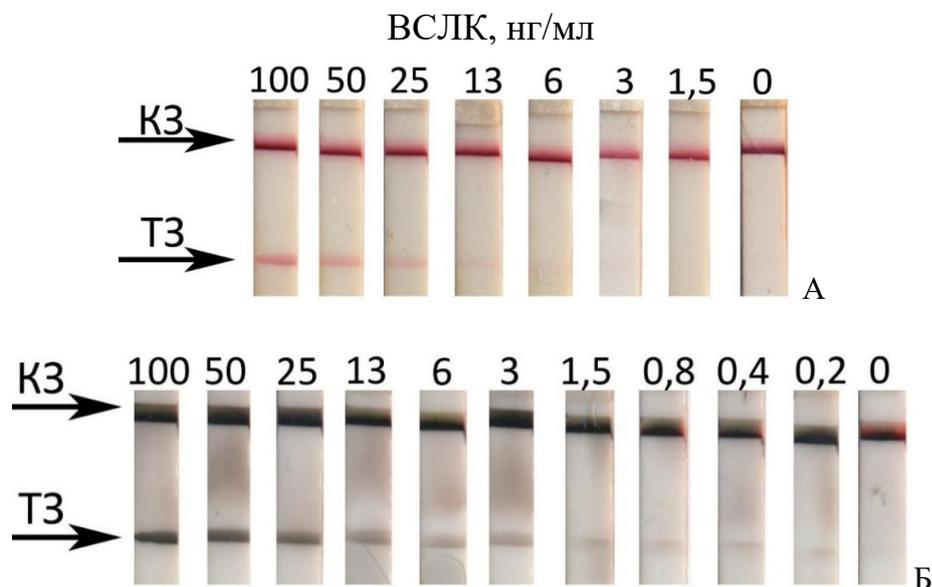


Рис. 50. Внешний вид тест-полосок после анализа ВСК в экстракте листьев. А – тест-полоски до усиления. Б – тест-полоски после серебряного усиления. КЗ – контрольная зона, ТЗ – тестовая зона

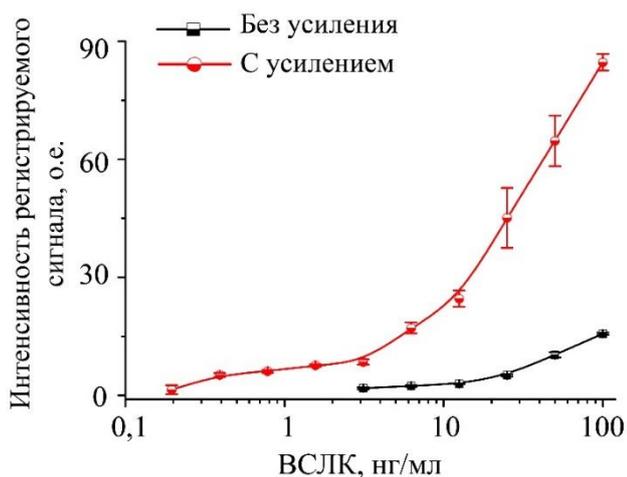


Рис. 51. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ВСК. ИХА с серебряным усилением и без него в экстракте листьев картофеля. $n = 4$

Метод серебряного усиления позволяет значительно увеличить интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне для ИХА ВСК в буфере и экстракте листьев картофеля (рис. 50) и снизить предел обнаружения ВСК в 15 раз – с 3 до 0,2 нг/мл (рис. 51). Компоненты растительного матрикса листьев не приводят к снижению эффективности амплификации сигнала и росту фонового окрашивания. Общее время анализа, включая подготовку проб, не превышает 15 минут.

Сравнение разработанного метода ИХА с серебряным усилением с ИФА и ИХА без усиления проводили на примере трех зараженных растений. Зараженный экстракт листьев

картофеля последовательно разбавляли здоровым экстрактом. Полученные зависимости сигнала в ИФА, ИХА без и с серебряным усилением от разведения экстракта №1 представлены на рис. 52 и обобщены для трех экстрактов в табл. 10.

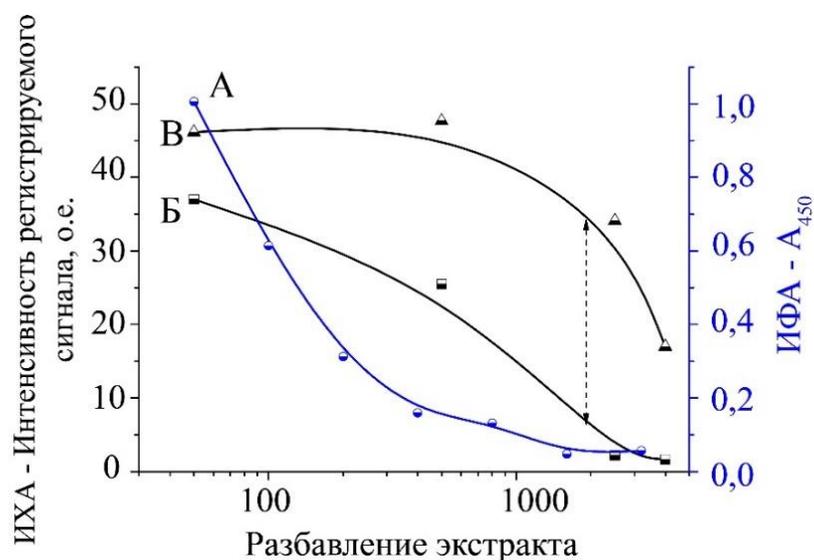


Рис. 52. Зависимости интенсивностей сигналов (ИФА – A₄₅₀; ИХА – интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне) от разбавления ВСЛК-содержащего экстракта. А – ИФА; Б – ИХА без усиления; В – ИХА с серебряным усилением

Табл. 10. Результаты ИФА, ИХА без усиления и ИХА с серебряным усилением для ВСЛК-содержащих экстрактов при разных разбавлениях

Проба	Разбавление	ИФА	ИХА	ИХА с серебряным усилением
Экстракт №1	1:50	+	+	+
	1:500	+	+	+
	1:2500	-	-	+
	1:4000	-	-	+
Экстракт №2	1:50	+	+	+
	1:500	+	+	+
	1:2500	-	-	+
	1:4000	-	-	+
Экстракт №3	1:50	+	+	+
	1:500	+	+	+
	1:2500	-	+/-	+
	1:4000	-	-	+

ИХА с серебряным усилением позволяет определять ВСЛК в более разбавленных экстрактах по сравнению с ИФА и ИХА без усиления (т.е. обнаруживать меньшие количества вируса в пробе). Например, для экстракта №1 ИФА не выявляет ВСЛК при разбавлении 1:2500, а интенсивность сигнала тестовой зоны для ИХА без усиления оказывается недостаточной для достоверного подтверждения вируса (1:2500). ИХА с серебряным усилением позволяет определять ВСЛК даже при разбавлении экстрактов № 1-3 в 4000 раз (табл. 10).

Полученные результаты для ИХА с серебряным усилением для бактериального и вирусного патогена показали, что серебряное усиление является простым в исполнении методом, не требующим специальных навыков, не занимающим много времени (до 5 минут), позволяющим значительно снизить предел обнаружения. Разработанные тест-системы с серебряным усилением были успешно использованы для высокочувствительного определения ВСЛК и *R. solanacearum* во внелабораторных условиях.

3.4.3.4. Оптимизация условий золотого усиления

Для оптимизации условий золотого усиления в работе исследовали влияние концентраций компонентов на увеличение размера затравочных НЧЗ. Рост НЧЗ основан на восстановлении ЗХВК на поверхности частиц в присутствии пероксида водорода (усиливающий раствор). На первом этапе методом спектрофотометрии определяли влияние компонентов на рост НЧЗ в коллоидном растворе. Спектральные изменения (увеличение поглощения, сдвиг длины волны с максимальным поглощением) свидетельствуют об изменении размера [201] и морфологии [85] НЧЗ. Оптимальными считали условия, позволяющие получить максимальное увеличение A_{520} с сохранением агрегационной стабильности препарата НЧЗ. Прежде всего определяли влияние значения рН среды (рис. 53 А) и концентрации пероксида водорода (рис. 53 Б) на изменение максимума поглощения.

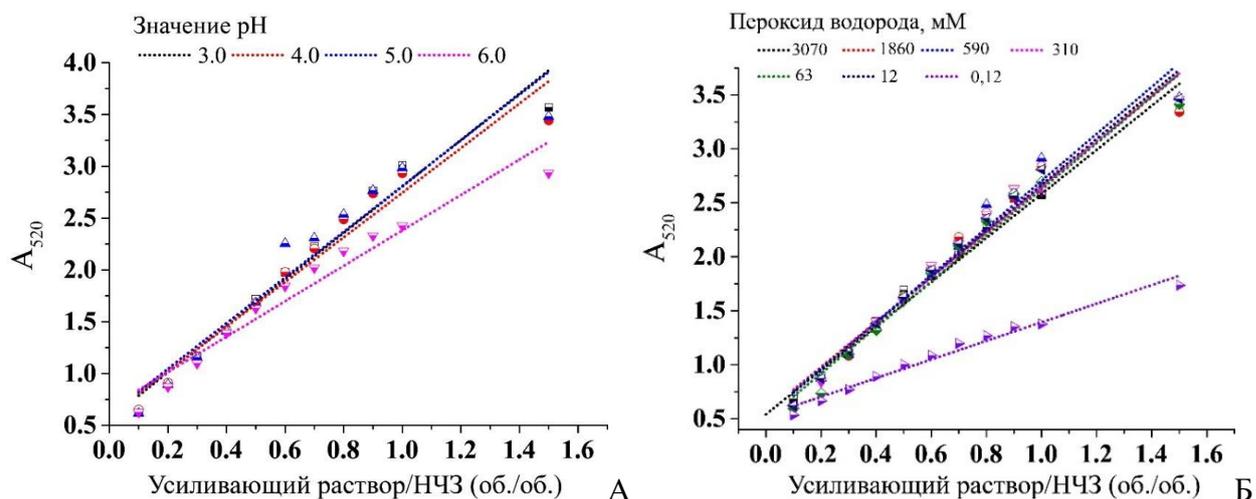


Рис. 53. Зависимости значений максимального поглощения (A_{520}) от соотношения НЧЗ/усиливающий раствор при различных значениях pH (А) и концентрации пероксида водорода (Б) в усиливающем растворе

В ходе предварительных экспериментов было установлено, что при добавлении ЗХВК в раствор пероксида водорода при $\text{pH} \geq 7$ происходит образование НЧЗ даже в отсутствие затравочных частиц. Способность ЗХВК восстанавливаться до НЧЗ в растворах с щелочным pH была также показана Dias и соавт. [83]. Таким образом, значения $\text{pH} > 6$ для усиливающего раствора не применимы из-за восстановления ЗХВК в растворе, а не на поверхности затравочных НЧЗ. В дальнейших экспериментах использовали $\text{pH} = 5,0$.

Восстановителем ЗХВК является пероксид водорода, поэтому его концентрация определяет увеличение размера частиц. Восстановление ЗХВК на НЧЗ происходит в широком диапазоне концентраций пероксида водорода – от 3 М до 120 мкМ. Однако уменьшение концентрации пероксида водорода до 120 мкМ приводит к резкому снижению A_{520} из-за нехватки восстановителя и, как следствие, формированию малого количества НЧЗ с увеличенными размерами (рис 53, Б). Стабильное и воспроизводимое значение A_{520} наблюдается при концентрации пероксида водорода 1,86 М.

В результате оптимизации состава усиливающего раствора выбраны следующие значения: $\text{pH} = 5,0$; 2,5 мМ ЗХВК; 1,86 М H_2O_2 . На рис. 54 показаны спектры препаратов коллоидных растворов НЧЗ при добавлении различных объемов усиливающего раствора.

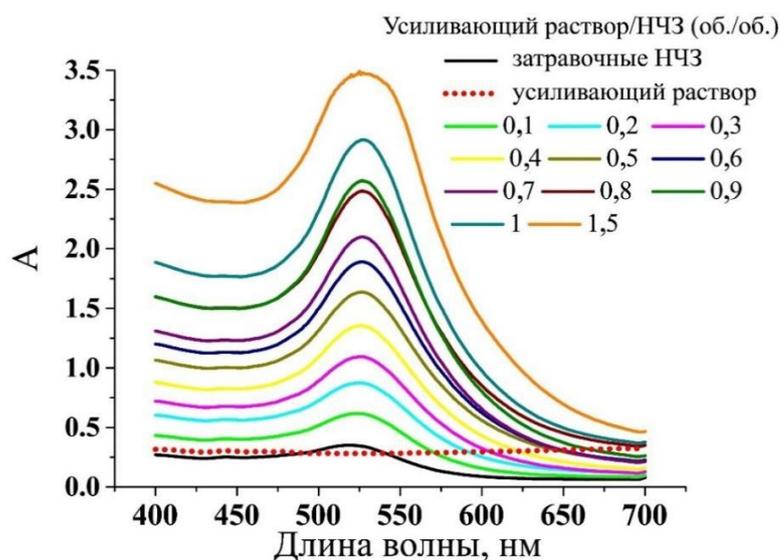


Рис. 54. Спектры коллоидных растворов НЧЗ после добавления различных объемов усиливающего раствора

Значения A_{520} зависят от объема добавленного усиливающего раствора. При добавлении 150 мкл усиливающего раствора к 100 мкл НЧЗ (соотношение усиливающий раствор/НЧЗ равно 1,5) A_{520} увеличивается более чем в 10 раз. Показано отсутствие поглощения при 520 нм для усиливающего раствора без добавления затравочных частиц, т.е. восстановление ЗХВК не происходит (рис. 54, усиливающий раствор) даже при продолжительной инкубации (более 8 часов). Добавление усиливающего раствора к НЧЗ приводит к сдвигу пика максимальной длины волны поглощения с 517 нм (для затравочных НЧЗ) до 520 нм (соотношение усиливающий раствор/НЧЗ равно 0,1) и 527 нм (соотношение усиливающий раствор/НЧЗ равно 0,5 и более), что, согласно Khlebtsov [201], свидетельствует о формировании НЧЗ с диаметром около 36 нм.

Для исследования размера частиц в препаратах при различных соотношениях усиливающий раствор/НЧЗ были использованы методы ПЭМ и ДЛСР. Установлено (рис. 55), что форма наращённых частиц близка к сферической, показано отсутствие агрегатов. Восстановление ЗХВК на поверхности НЧЗ в присутствии пероксида водорода приводит к формированию стабильных препаратов. Размеры НЧЗ представлены в табл. 11.

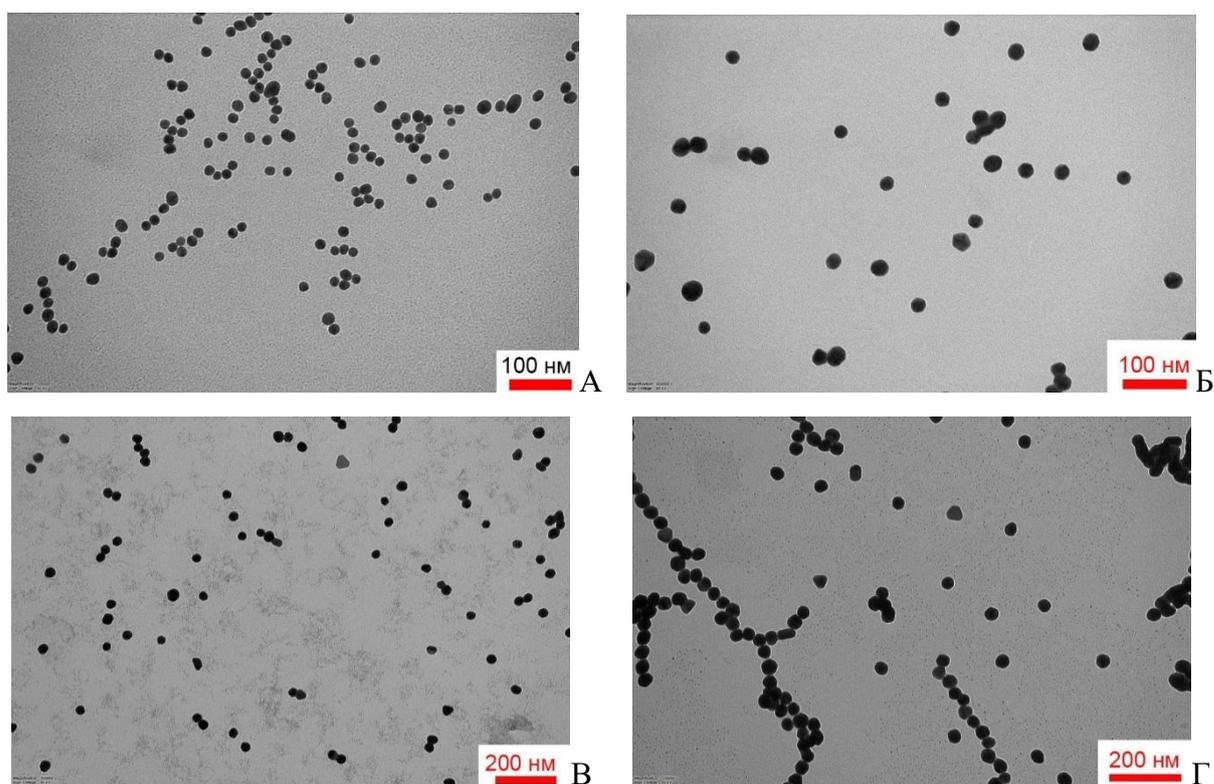


Рис. 55. Микрофотографии НЧЗ, полученных при добавлении разных объемов усиливающего раствора к исходным частицам в растворе. А – исходные НЧЗ. Соотношение усиливающий раствор/НЧЗ (об./об.): Б – 0,8; В – 1,2; Г – 2. Микрофотографии получены методом ПЭМ

Табл. 11. Размеры НЧЗ при различном соотношении усиливающий раствор/НЧЗ, определенные методами ПЭМ и ДЛСР

Соотношение усиливающий раствор/НЧЗ	Диаметр, нм	
	ПЭМ	ДЛСР
Исходные НЧЗ	$18,2 \pm 1,6$	$20,2 \pm 2,3$
0,1	-	$29,2 \pm 4,0$
0,2	-	$26,2 \pm 3,2$
0,3	-	$29,2 \pm 4,4$
0,4	-	$29,4 \pm 5,0$
0,5	-	$30,4 \pm 7,0$
0,6	-	$32,0 \pm 6,5$
0,7	-	$33,0 \pm 6,2$
0,8	$30,7 \pm 3,5$	$33,0 \pm 4,2$
0,9	-	$34,7 \pm 6,8$
1	-	$37,4 \pm 6,8$
1,2	$35,4 \pm 3,9$	$38,1 \pm 5,9$
1,5	-	$40,5 \pm 10,3$
2	$38,6 \pm 4,6$	$43,1 \pm 7,2$

Методы ПЭМ и ДЛСР показывают сопоставимые результаты и свидетельствуют о более чем двукратном увеличении размера частиц и подтверждают отсутствие в препаратах агрегатов и формирование гомогенных частиц.

Размер и форма наращенных частиц на затравочных НЧЗ определяются диффузией компонентов усиливающего раствора к поверхности частиц [226]. При восстановлении ЗХВК на поверхности НЧЗ в коллоидном растворе диффузия не затруднена, происходит равномерное увеличение частиц. Было выдвинуто предположение, что частичное блокирование поверхности НЧЗ, находящихся в пористых нитроцеллюлозных мембранах, затруднит поступление компонентов усиливающего раствора, что приведет к неравномерному увеличению затравочных частиц и формированию несферических НЧЗ. Для проверки предположения использовали два вида адсорбированных НЧЗ – нанесенные и высушенные на медной сеточке для ПЭМ и частицы, включенные в состав иммунных комплексов в тестовой зоне мембраны после ИХА ХВК (500 нг/мл) в буфере. К адсорбированным затравочным НЧЗ добавляли усиливающий раствор, выдерживали в течение одной минуты, промывали и визуализировали полученные частицы. В результате увеличения размера адсорбированных на медной сеточке НЧЗ формируются крупные (до 200 нм) несферические частицы (рис. 56).

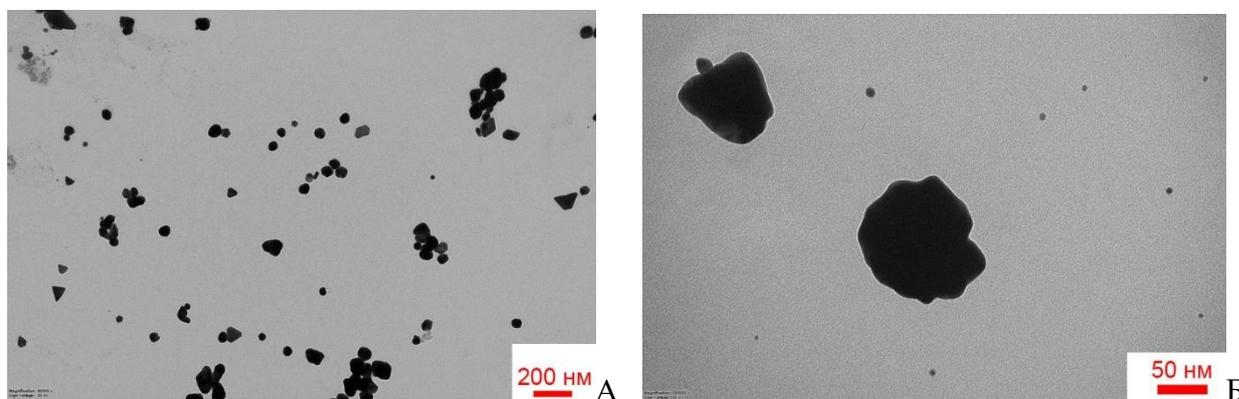


Рис. 56. Микрофотографии частиц, полученных при добавлении различных объемов усиливающего раствора к адсорбированным на сеточке НЧЗ. Соотношение усиливающий раствор/НЧЗ (об./об.) – А – 0,5, Б – 0,8

Для изучения размеров и морфологии НЧЗ, формирующихся в процессе восстановления ЗХВК на мембране, использовали метод СЭМ с регистрацией отраженных электронов. Интенсивность отраженных электронов для тяжёлых элементов (большой атомный номер, например, золото, железо и т.д.) много больше, чем для легких элементов (большинство органических соединений), что позволяет достоверно выявлять НЧЗ в пористых матриксах и биологических пробах [227]. Полученные результаты сканирования

исходных мембран, мембран после ИХА ХВК в буфере до и после золотого усиления представлены на рис. 57. На микрофотографиях немодифицированной мембраны видны наноразмерные структуры (рис. 57 А, Б). Однако для таких частиц интенсивность отраженных электронов низка и сопоставима с мембраной. На микрофотографиях тестовой зоны мембраны после проведения ИХА ХВК в буфере без золотого усиления (рис. 57 В, Г) показано присутствие НЧЗ с размером в пределах 20-30 нм. Детектируются как отдельные частицы сферической формы, так и их агрегаты. Интенсивность отраженных электронов для НЧЗ оказывается много больше по сравнению с нитроцеллюлозной мембраной. Таким образом, метод СЭМ с регистрацией отраженных электронов позволяет визуализировать НЧЗ на фоне соразмерных компонентов мембраны. На микрофотографиях тестовой зоны мембраны при ИХА с использованием золотого усиления (рис. 57 Д, Е) показано присутствие крупных несферических частиц размером до 500 нм. Методом СЭМ установлено, что при золотом усилении сферических НЧЗ, находящихся в порах мембраны, образуются крупные несферические частицы. Полученные результаты подтверждают влияние затрудненной диффузии компонентов усиливающего раствора на размер и форму частиц, формирующихся при восстановлении ЗХВК.

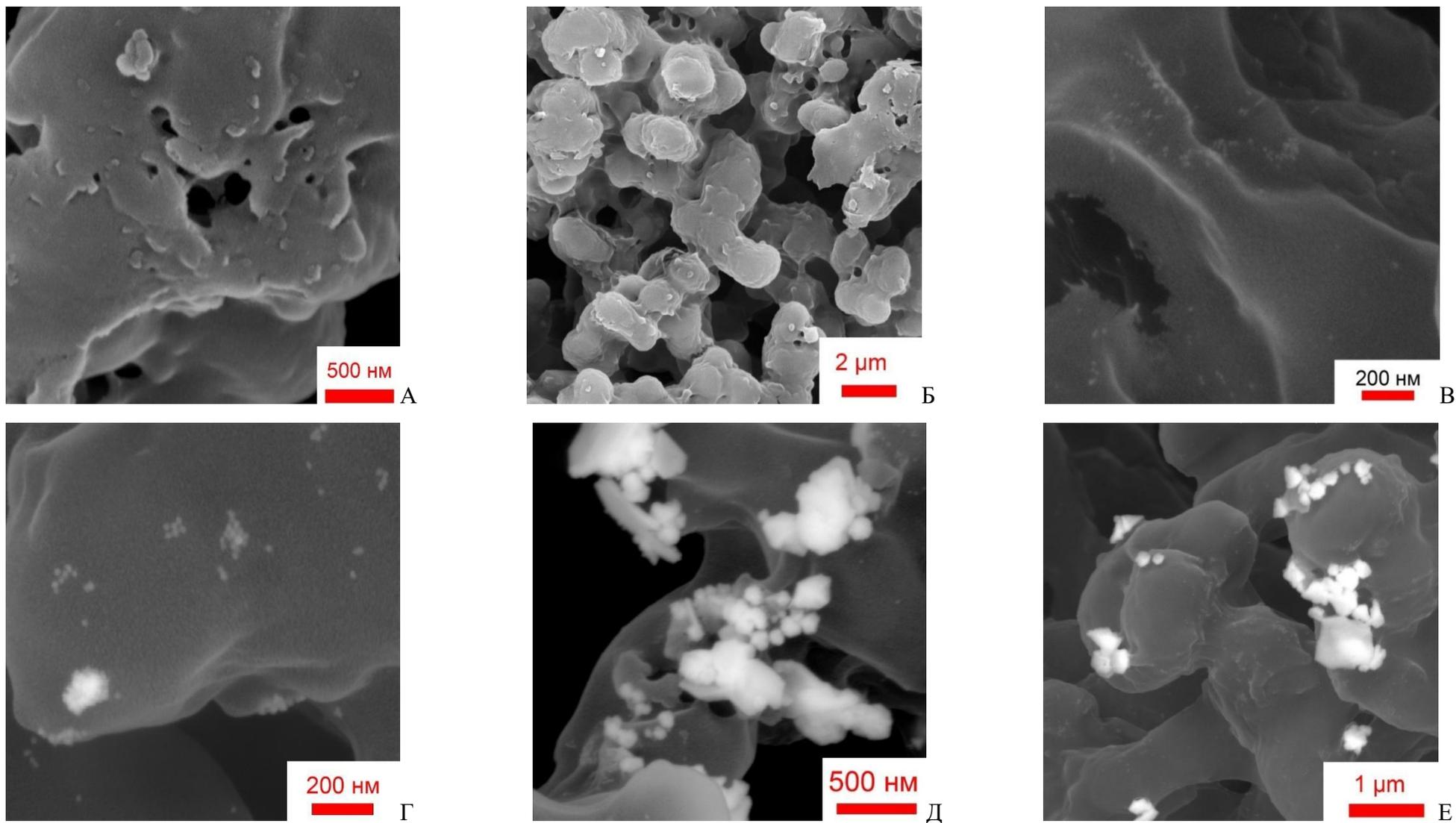


Рис. 57. Микрофотографии тестовых зон нитроцеллюлозных мембран Millipore 75, полученные методом СЭМ с регистрацией отраженных электронов. А, Б – мембрана до ИХА. В, Г – НЧЗ в тестовой зоне после ИХА ХВК (500 нг/мл) в буфере до золотого усиления. Д, Е – НЧЗ в тестовой зоне после ИХА ХВК (500 нг/мл) в буфере с золотым усилением

Сравнение гистограмм распределения по размерам исходных НЧЗ и частиц, получаемых после добавления усиливающего раствора к коллоидному раствору и иммобилизованным частицам, представлено на рис. 58.

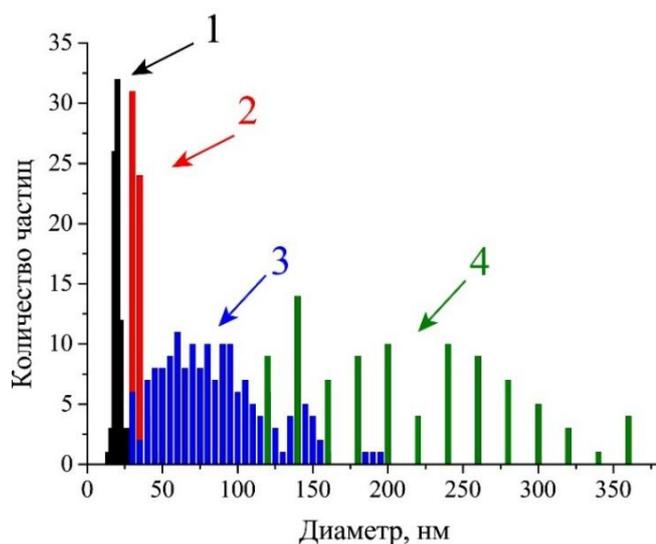


Рис. 58. Гистограммы распределения частиц по размерам, полученные методом ПЭМ и СЭМ. 1 – исходные НЧЗ (ПЭМ). Частицы после золотого усиления: 2 – в коллоидном растворе (ПЭМ); 3 – на медной сеточке (ПЭМ); 4 – на мембране (СЭМ). Соотношение усиливающий раствор/НЧЗ – 0,8

Восстановление ЗХВК на адсорбированных НЧЗ приводит к формированию существенно более крупных частиц (рис. 58, распределение 3 и 4) по сравнению с частицами, образующимися в коллоидном растворе при тех же условиях (рис. 58, распределение 2). В работе Yan и соавт. [228] показано формирование несферических крупнодисперсных НЧЗ пирамидальной формы с размером около 200 нм при восстановлении ЗХВК в присутствии пероксида водорода и цетилтриаммоний бромида на поверхности адсорбированных на электроде сферических НЧЗ. Однако авторы не рассматривали влияние блокирования поверхности на морфологию формирующихся частиц. В литературе также не показано использование крупнодисперсных несферических НЧЗ для снижения предела обнаружения ИХА. Однако, исходя из увеличения коэффициента молярной экстинкции для крупных НЧЗ [41], снижение ПО является ожидаемым.

3.4.3.5. Использование золотого усиления для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа

Определяли оптимальное время инкубации усиливающего раствора на тест-полоске. Для этого проводили ИХА буфера без ХВК (отрицательный контроль) и пробы с ХВК (4 нг/мл), после чего на тест-полоски добавляли 10 мкл усиливающего раствора и регистрировали изменение интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне. Оптимальным считали время инкубации, позволяющее получить максимальный прирост интенсивности сигнала для положительных проб с отсутствием фона для отрицательных. Полученные результаты представлены на рис. 59.

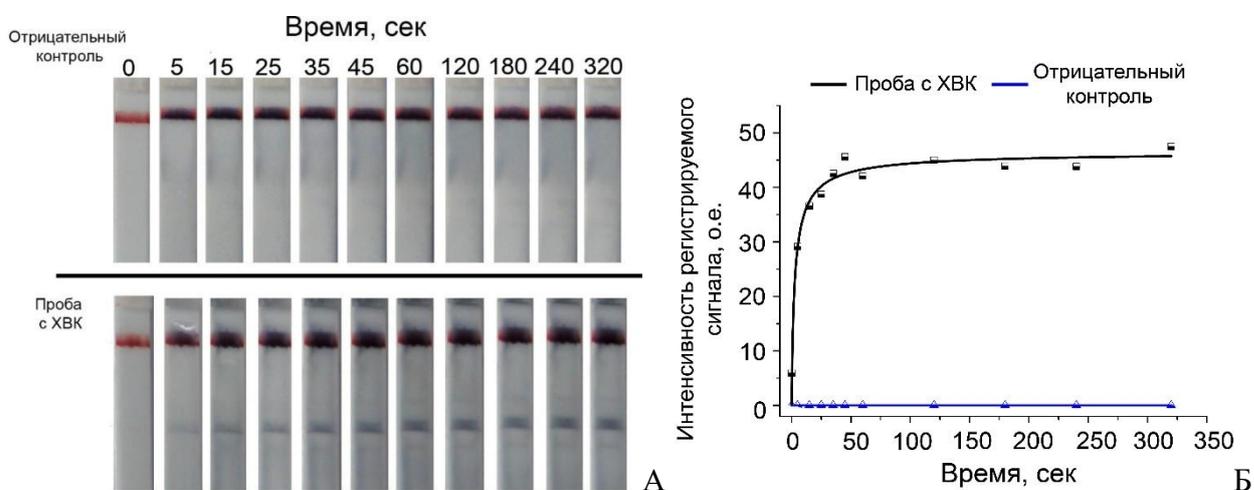


Рис. 59. Золотое усиление на тест-полосках для отрицательного контроля и пробы с ХВК (5 нг/мл) в ФБС-Т. А – внешний вид тест-полосок при разном времени инкубации усиливающего раствора. Б – зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от времени инкубации

Показано отсутствие регистрируемого ложноположительного сигнала в тестовой зоне для отрицательного контроля в течение продолжительной инкубации (более 300 секунд). Для положительной пробы основной прирост интенсивности регистрируемого сигнала наблюдается в первые 60 секунд (рис. 59, Б). При этом происходит изменение цвета тестовой зоны с красного на темно-синий (рис. 59, А), обусловленное оптическими свойствами крупных НЧЗ.

Для подтверждения химической природы частиц, визуализированных после золотого усиления на мембранах (рис. 57 Д, Е), использовали метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии [229]. Для этого методом СЭМ визуализировали тестовую область после ИХА в буфере (ХВК 500 нг/мл) с золотым усилением (рис. 60 А). Спектр

фрагмента мембраны с визуализированными частицами представлен на рис. 60 Б, спектральные линии – в табл. 12.

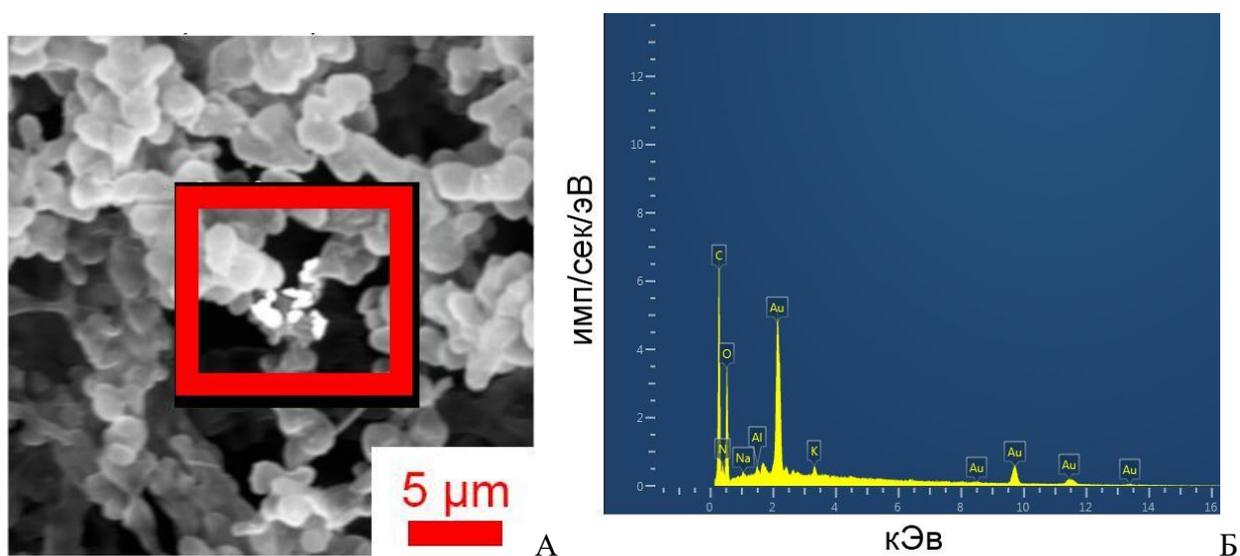


Рис. 60. Характеристика химической природы наночастиц на тест-полосках методом ЭРС. А – СЭМ микрофотография после золотого усиления. Красным прямоугольником отмечена область спектральной характеристики. Б – спектр участка рабочей мембраны с частицами после золотого усиления

Табл. 12. Спектральные характеристики фрагмента мембраны

Элемент	Тип линии	Вес, %	Эталон
N	К серия	10.71	BN
O	К серия	39.79	SiO ₂
Na	К серия	0.83	NaCl
Al	К серия	0.77	Al ₂ O ₃
K	К серия	1.61	KBr
Au	М серия	46.29	Au
Сумма:		100.00	

Полученные результаты показывают присутствие золота (46,29%) в анализируемом фрагменте мембраны. М-линия (2,12 кЭв) и La-линия (9,71 кЭв) спектра характерны для золота [230]. Азот, калий и кислород входят в состав нитроцеллюлозной мембраны. Присутствие незначительного количества алюминия (0,77%) может быть связано с контаминацией при контакте с алюминиевой упаковкой в процессе хранения.

Метод золотого усиления был использован для снижения предела обнаружения ХВК в экстракте листьев картофеля. Внешний вид тест-полосок до и после усиления показан на рис. 61. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ХВК представлены на рис. 62.

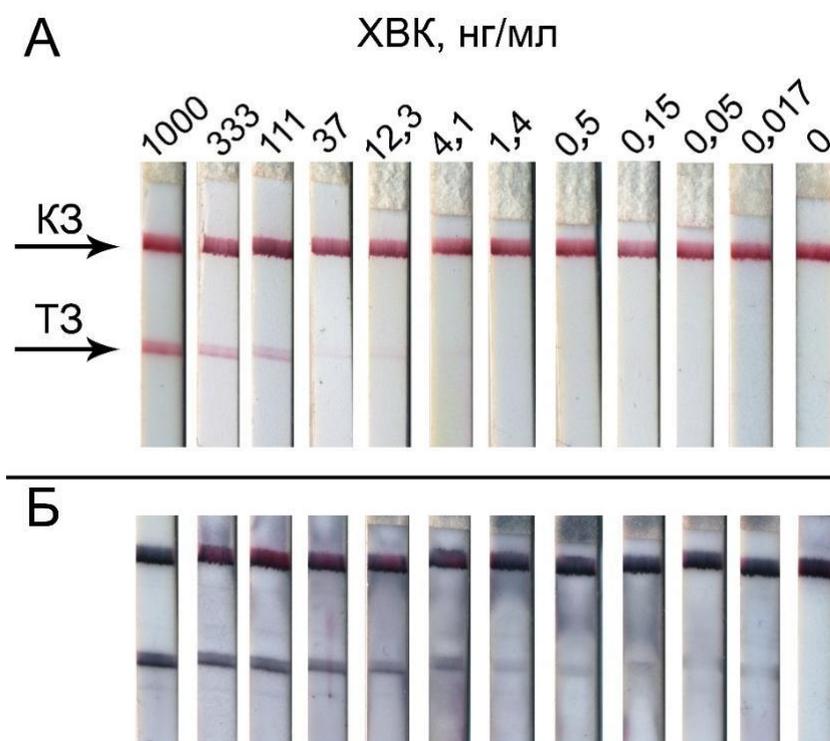


Рис. 61. Внешний вид тест-полосок после ИХА ХВК в экстракте листьев картофеля до (А) и после (Б) золотого усиления. Концентрация ХВК указана над тест-полосками. КЗ – контрольная зона, ТЗ – тестовая зона

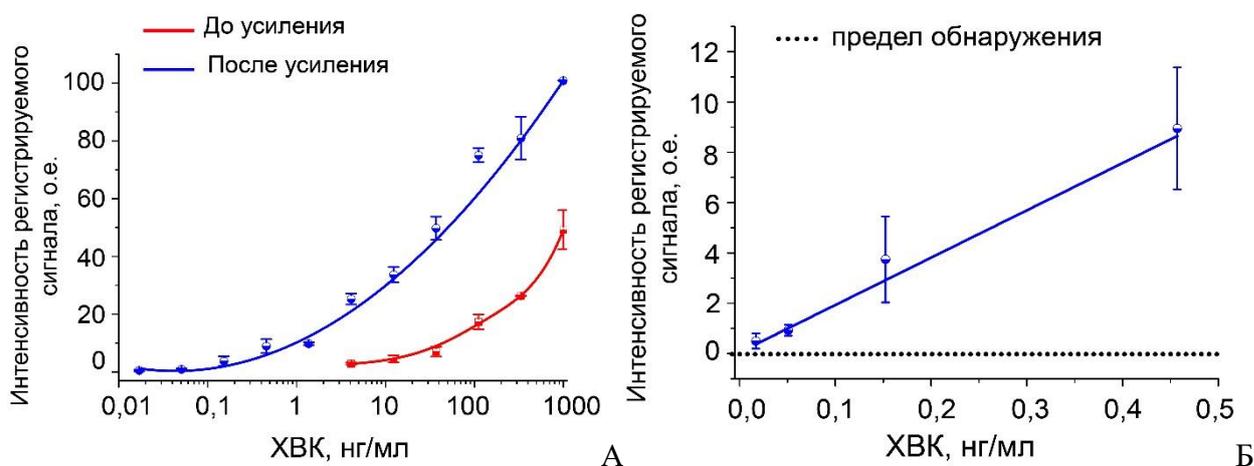


Рис. 62. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентрации ХВК до и после золотого усиления ХВК в экстракте листьев картофеля (А). Интенсивность окрашивания тестовой зоны после золотого усиления при низких концентрациях (Б). n = 5

Предел обнаружения ХВК в экстракте листьев картофеля составляет 4,1 нг/мл, компоненты растительного матрикса не оказывают влияния на характеристики ИХА. Метод золотого усиления позволяет значительно увеличить интенсивность сигнала в тестовой зоне (рис. 61) и снизить предел обнаружения ИХА в 240 раз – до 0,017 нг/мл (рис. 62, А). Величина интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне при низких концентрациях вируса оказывается достоверно выше фонового сигнала (рис. 62, Б).

Применимость данного подхода для определения низких концентраций была подтверждена на панели из 20 зараженных и 16 здоровых растений. Для получения проб с низким содержанием вируса готовили серию 50-кратных разбавлений экстрактов зараженных растений. В результате приготовлено 170 зараженных и 49 здоровых экстрактов. Полученные пробы были проанализированы ИХА без золотого усиления (рис. 63). Метод ИХА позволяет выявлять вирус только в 117 из 170 зараженных экстрактов. Содержание ХВК в остальных 53 экстрактах оказывается ниже предела обнаружения (количество ложноотрицательных результатов показано зеленым на рис. 63, до золотого усиления). Использование золотого усиления позволяет выявлять ХВК во всех зараженных 170 пробах, в том числе во всех зараженных пробах, для которых ИХА без усиления показывал отрицательный результат (рис. 63, после золотого усиления, отмечено зеленым). При этом ложноположительные результаты не наблюдались – 53 отрицательных результата анализа (рис. 63, после золотого усиления).

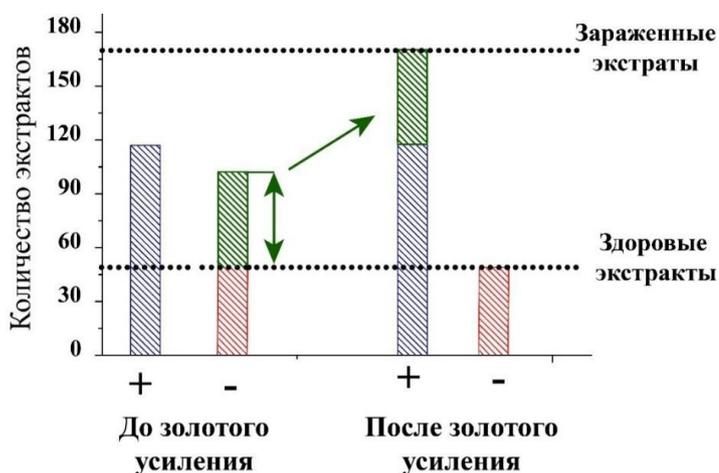


Рис. 63. Сравнение качественных результатов ИХА экстрактов до золотого и после золотого усиления. (+) и (-) отображают положительный и отрицательный результат анализа. Количество зараженных (170) и здоровых экстрактов (53) показано пунктирными линиями.

Разработаны три новых подхода для снижения пределов обнаружения ИХА. Предложенные подходы основаны на:

- магнитном концентрировании антигена и формировании гетероагрегатов магнитных частиц с наночастицами золота в тестовой зоне;
- использовании двух взаимодействующих друг с другом конъюгатов наночастиц золота со специфическими антителами и с антивидовыми антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой. Формирование иммунных комплексов в тестовой зоне регистрируется по накоплению нерастворимых окрашенных продуктов ферментативной реакции;
- восстановлении золотохлористоводородной кислоты в присутствии пероксида водорода на поверхности наночастиц золота в тестовой зоне.

Метод серебряного усиления был впервые использован для снижения предела обнаружения фитопатогенной бактерии.

В табл. 13 представлена характеристика способов снижения пределов обнаружения ИХА. Все разработанные подходы позволяют значительно снизить пределы обнаружения без существенного усложнения анализа и могут быть использованы для внелабораторной диагностики фитопатогенов пользователями без специальной подготовки.

Табл. 13. Характеристика методов снижения пределов обнаружения ИХА

Характеристика	Подходы, основанные на:			
	агрегации МЧ-НЧЗ	регистрации активности ЦФ	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 H ₂ O ₂
Длительность амплификации сигнала	30 минут	5 минут	5 минут	1 минута

3.5. Разработка мультипорогового и мультиплексного иммунохроматографического анализа

Предлагаемые форматы ИХА представляют практический интерес, поскольку позволяют снизить время и трудозатраты на скрининговые исследования большого массива образцов. Мультипороговый ИХА может использоваться для оценки диапазона концентраций антигена в пробе без применения дополнительного оборудования. Мультиплексный ИХА выявляет в пробе несколько фитопатогенов в рамках одного анализа. Полученные первичные результаты (диапазон содержания антигена в пробе и присутствие/отсутствие основных патогенов вирусной и бактериальной природы) при необходимости могут быть подтверждены с использованием дополнительных лабораторных методов (ИФА, ПЦР, культивирование бактерий на селективных средах и др.). Результаты, полученные разработанными форматами ИХА, представляют интерес для практических целей фитопатологии (скрининг посевного материала на заражение, анализ большого количества проб в полевых условиях).

3.5.1. Мультипороговый иммунохроматографический анализ

Для определения количественного диапазона содержания антигена в данной работе предложен одностадийный формат ИХА, не требующий построения калибровочных зависимостей и использования детекторов. Принцип анализа заключается в нанесении на мембрану трех тестовых зон с разной концентрацией антител, отличающихся по кинетическим константам взаимодействия с антигеном (ХВК). Изменение концентрации иммобилизованных антител и их аффинности позволяет варьировать количество специфических иммунных комплексов, образующихся в разных тестовых зонах. Смесь конъюгата МЧ с анализируемой пробой вносится на тест-полоску. Проба мигрирует по тест-полоске и последовательно проходит через все три тестовые зоны. Система основана на последовательном истощении количества антител в тестовых зонах при миграции двойных иммунных комплексов [ХВК – МЧ] вдоль тест-полоски. При наличии антигена в пробе происходит его связывание и формирование тройных иммунных комплексов в тестовой зоне. Чем выше аффинность и концентрация иммобилизованных антител, тем большее количество иммунных комплексов формируется при прохождении пробы через тестовую зону. Таким образом, чем больше формируется иммунных комплексов в тестовой зоне, тем ниже концентрация вируса, при которой происходит окрашивание тестовой зоны. Мультипороговый ИХА основан на формировании нескольких тестовых зон, окрашивание каждой из которых происходит при достижении определенной концентрации ХВК в пробе. Оценка количественного диапазона содержания ХВК основана на подсчете окрашенных зон и не требует дополнительного оборудования.

3.5.1.1. Оптимизация условий мультипорогового иммунохроматографического анализа

Оптимизированы условия, обеспечивающие максимальную интенсивность окрашивания тестовой зоны для проб с ХВК и отсутствие фона. В качестве маркера использовали конъюгат МЧ с мАт клона 3G4.

Для мембран с малым размером пор (Millipore 135, 180) миграция крупных конъюгатов МЧ затруднена. Наименьшее фоновое окрашивание показала мембрана Millipore 75, которая была выбрана для дальнейшей работы.

Для оптимизации состава буфера сравнивали ФБС и Трис-буфер, а также варьировали тип детергента (Твин-20, тритон X-100, додецилсульфат натрия). Наименьшее фоновое окрашивание наблюдается при использовании ФБС-Т. Замена детергента на Твин-20 в том же количестве (0,05%) не приводит к изменениям фона и скорости миграции МЧ. При добавлении в буфер додецилсульфата натрия (0,03%) МЧ не способны мигрировать по тест-полоске. Дальнейшие эксперименты были проведены с использованием ФБС-Т.

Для синтеза конъюгатов с МЧ использовали мАт клона 3G4. Выбор данных антител обусловлен тем, что из всей панели использованных в работе антител к ХВК они обладают наибольшей кинетической константой ассоциации (табл. 6). Исследовали влияние количества антител (0,4; 4; 20; 32; 40; 120; 200 мкг) при иммобилизации на МЧ (конечное количество МЧ $\approx 2 \times 10^{10}$ частиц) на интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне при различном содержании ХВК (500, 300, 100 нг/мл). Как было показано нами ранее, выбранные условия конъюгации обеспечивают иммобилизацию около 90% от добавленного количества антител (раздел 3.2.5.). Таким образом, расчетное количество молекул антител на одну магнитную частицу составляет $8,4 \times 10^4$, $8,4 \times 10^5$, $4,2 \times 10^6$, $6,3 \times 10^6$, $8,4 \times 10^6$, $2,5 \times 10^7$, $4,2 \times 10^7$. Результаты сравнения конъюгатов по связыванию в ходе ИХА представлены на рис. 64.

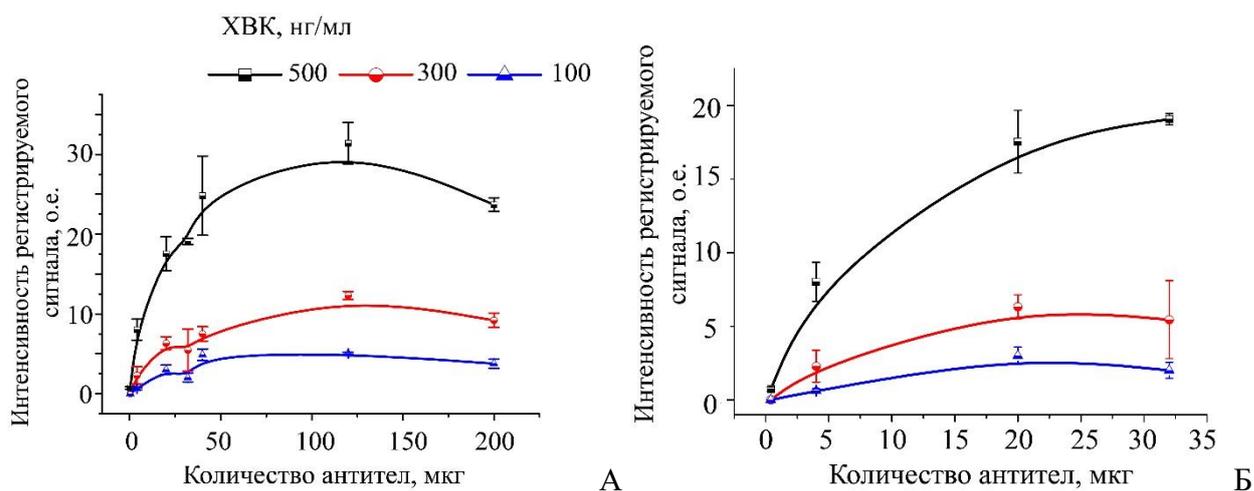


Рис. 64. Зависимости интенсивностей сигналов в тестовых зонах для конъюгатов с различным количеством антител при синтезе: А - от 0 до 200 мкг; Б - от 0 до 32 мкг. n = 3

При увеличении количества добавляемых при синтезе антител с 0,4 до 32 мкг (расчетное количество иммобилизованных антител на частицу – $6,3 \times 10^6$) происходит рост интенсивности регистрируемого сигнала в тестовой зоне (рис. 64, Б). Наибольшая интенсивность сигнала наблюдается для конъюгата МЧ, полученного при добавлении 120 мкг антител (расчетное количество антител на частицу – $2,5 \times 10^7$) (рис. 64, А). Данный конъюгат был использован для дальнейших экспериментов.

Для создания мультипорогового анализа предложено варьировать два параметра, определяющих количество тройных иммунных комплексов в тестовых зонах: 1) концентрацию антител, иммобилизуемых в тестовой зоне, 2) аффинность антител, иммобилизуемых в тестовой зоне. Варьирование второго параметра проводили на основе трех препаратов антител (двух мАт и одного пАт), характеристики которых приведены в табл. 6. Выбранные условия были использованы для разработки мультипорогового ИХА.

3.5.1.2. Изменение предела обнаружения мультипорогового ИХА

Схема ИХА с тремя тестовыми зонами и предварительной инкубацией конъюгата МЧ с ХВК представлена на рис. 65. Математическое описание процессов формирования иммунных комплексов при миграции пробы вдоль тест-полоски с тремя нанесенными тестовыми зонами проводили на основании модели, разработанной Qian и Bau [36], описывающей формирование «сэндвич» иммунных комплексов на тест-полоске с одной зоной связывания. Предложенная нами модель учитывает влияние расположения тестовых зон на формирование иммунных комплексов и позволяет установить основные параметры, влияющие на ПО каждой тестовой зоны. Модель предполагает, что все реагирующие компоненты системы хорошо перемешаны и способны взаимодействовать между собой без стерических затруднений, а сорбированные на мембране реагенты равномерно

распределены в реакционном объеме и остаются в активном состоянии. Иммунизированные в тестовой зоне антитела не вымываются и остаются в активном состоянии.

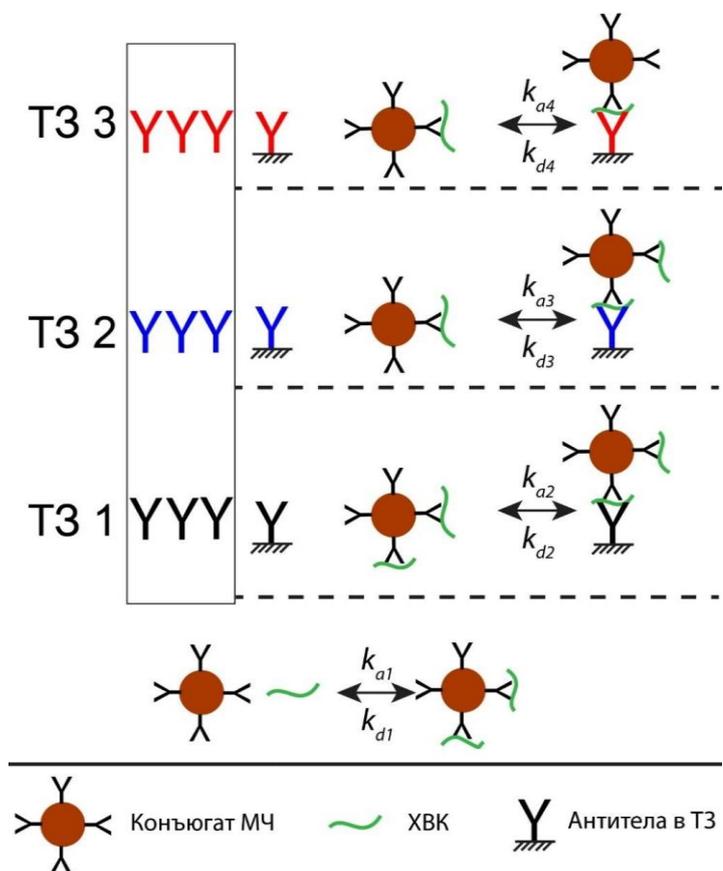


Рис. 65. Схема формирования иммунных комплексов в системе ИХА с тремя ТЗ

При смешивании пробы, содержащей ХВК, и конъюгата МЧ с антителами происходит формирование комплексов ХВК – МЧ:

$$\frac{d [\text{ХВК-МЧ}]}{dt} = k_{a1}[\text{ХВК}][\text{МЧ}] - k_{d1}[\text{ХВК - МЧ}] \quad (1)$$

Принимаем, что 10-минутной инкубации достаточно для связывания ХВК, а диссоциация комплексов ХВК – МЧ за время анализа не происходит. Частица конъюгата МЧ содержит большое количество молекул антител и вступает с вирионом ХВК во множество (N) иммунных взаимодействий. Таким образом, аффинность поливалентного взаимодействия ХВК – МЧ много больше по сравнению с аффинностью взаимодействия

мАт – ХВК, поскольку для диссоциации иммунного комплекса необходимо разорвать множество связей [231]. После десятиминутной инкубации в пробе нет свободного ХВК, присутствуют только комплексы ХВК-МЧ и свободные МЧ.

При миграции вдоль тест-полоски проба последовательно проходит через несколько зон с нанесенными антителами. Принимаем, что неспецифическое связывание конъюгата с мембраной отсутствует. В тестовых зонах (ТЗ₁₋₃) происходит формирование тройных иммунных комплексов Ат – ХВК – конъюгат МЧ. Интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне пропорциональна количеству образующихся иммунных комплексов. Иммунные комплексы в ТЗ могут образовывать только свободные антитела [А_{своб}], которые определяются как разница между общим количеством антител в тестовой зоне [А_{общ}] и количеством антител, связанных с двойным иммунным комплексом [А – ХВК – МЧ].

$$[A_{своб\ i}] = A_{общ\ i} - [A_i - ХВК - МЧ] \quad (2)$$

Формирование иммунных комплексов в ТЗ₁:

$$\frac{d[A_1 - ХВК - МЧ]}{dt} = k_{a2}[ХВК - МЧ]([A_{общ1}] - [A_1 - ХВК - МЧ]) \quad (3)$$

Часть иммунных комплексов ($[ХВК - МЧ] - [A_1 - ХВК - МЧ]$) мигрирует вдоль ТЗ₁ и не формирует тройных иммунных комплексов из-за недостаточного количества свободных антител или низкой скорости ассоциации. Потенциально часть сформировавшихся тройных иммунных комплексов в ТЗ₁ может диссоциировать ($k_{d2}[A_1 - ХВК - МЧ]$) на свободные антитела и $[ХВК-МЧ]$. Однако время миграции пробы вдоль тест-полоски составляет 10 минут, поэтому диссоциация таких комплексов во всех трех ТЗ – ТЗ₁ ($k_{d2}[A_1 - ХВК - МЧ]$), ТЗ₂ ($k_{d3}[A_2 - ХВК - МЧ]$), ТЗ₃ ($k_{d4}[A_3 - ХВК - МЧ]$) маловероятна и может не учитываться.

Формирование иммунных комплексов в ТЗ₂:

$$\frac{d[A_2 - ХВК - МЧ]}{dt} = k_{a3}([ХВК - МЧ] - [A_1 - ХВК - МЧ]) ([A_{общ2}] - [A_2 - ХВК - МЧ]) \quad (4)$$

Количество иммунных комплексов в ТЗ₂ определяется теми же параметрами, что и для ТЗ₁. Однако формирование иммунных комплексов в ТЗ₂ зависит также от антигенсвязывающей активности ТЗ₁: чем больше комплексов в ТЗ ([A₁ – ХВК – МЧ]), (уравнение 3), тем меньше их в ТЗ₂ ($k_{a3}([ХВК – МЧ] – [A_1 – ХВК – МЧ])$). Таким образом, предел обнаружения ТЗ₂ зависит не только от кинетических констант ассоциации/диссоциации антител в ТЗ₂ (k_{a3} и k_{d3}) и их концентраций, но и от количества иммунных комплексов в ТЗ₁ (а значит, и k_{a2} , k_{d2} , $A_{общ1}$).

Формирование иммунных комплексов в ТЗ₃

$$\frac{d[A_3-ХВК-МЧ]}{dt} = k_{a4}([ХВК – МЧ] – ([A_1 – ХВК – МЧ] + [A_2 – ХВК – МЧ])([A_{общ3}] – [A_3 – ХВК – МЧ])) \quad (5)$$

Количество иммунных тройных иммунных комплексов в ТЗ₃ определяется их количеством в двух первых зонах: чем больше формируется комплексов в ТЗ₁ ([A₁ – ХВК – МЧ]) (уравнение 3) и 2 ([A₂ – ХВК – МЧ]) (уравнение 4), тем меньшее количество двойных иммунных комплексов [ХВК – МЧ] мигрирует через ТЗ₃. Предел обнаружения ТЗ₃ определяется не только кинетическими константами ассоциации/диссоциации иммобилизованных антител (k_{a4} и k_{d4}) и их концентрацией, но и количеством иммунных комплексов (антиген-связывающей активностью) в ТЗ₁ и ТЗ₂ (а значит, и $k_{a1,2}$, $k_{d1,2}$, $A_{общ1,2}$).

Таким образом, для увеличения количества иммунных комплексов (антигенсвязывающей активности) и, как следствие, снижения концентрации ХВК, при которой происходит формирование окраски данной тестовой зоны, необходимо:

- использовать антитела с высокой кинетической константой ассоциации (k_a) и низкой кинетической константой диссоциации (k_d),
- повышать концентрацию иммобилизованных антител ($A_{общ1}$) в тестовой зоне,
- увеличивать количество двойных иммунных комплексов [ХВК – МЧ] за счет увеличения кинетической константы ассоциации МЧ с ХВК (k_{a1}), а также повышения концентрации [ХВК – МЧ].

Для повышения концентрации иммунных комплексов может быть использовано их магнитное концентрирование из пробы.

3.5.1.3. Мультипороговый формат иммунохроматографического анализа для определения X вируса картофеля

Для мультипорогового ИХА на тест-полоски наносили антитела с разной аффинностью, варьируя их концентрации (табл. 14). Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в каждой из зон от концентрации ХВК в пробе представлены на рис. 66. Для каждого из вариантов определен предел обнаружения ХВК, результаты суммированы в табл. 14.

Табл. 14. Сравнение пределов обнаружения мультипорогового ИХА для трех тестовых зон разного состава

Вариант	Антитела и их концентрация (мг/мл) в тестовой зоне			Предел обнаружения, нг/мл		
	ТЗ 1	ТЗ 2	ТЗ 3	ТЗ 1	ТЗ 2	ТЗ 3
А	пАт; 1.0	1А5; 0.3	1А5; 0.1	3	600	2000
Б	пАт; 1.0	3G4; 0.5	3G4; 0.2	3	30	150
В	пАт; 1.0	3G4; 0.8	3G4; 0.4	3	30	80
Г	пАт; 0.8	3G4; 0.5	3G4; 0.2	10	25	60
Д	3G4; 1.0	3G4; 0.5	3G4; 0.2	8	20	60
Е	пАт; 0.5	3G4; 0.5	3G4; 0.5	15	35	80
Ж	пАт; 1.0	1А5; 0.5	1А5; 0.2	3	200	550
З	пАт; 1.0	1А5; 1.0	1А5; 0.5	3	150	300

Как видно из табл. 14 и рис. 66, пределы обнаружения ТЗ₁₋₃ значительно меняются при варьировании двух выбранных параметров (концентрации и аффинности иммобилизуемых антител). Увеличение предела обнаружения ТЗ происходит при иммобилизации антител с меньшей аффинностью или при снижении их концентрации. Например, при замене в ТЗ₂ мАт клона 3G4 (Б) на менее аффинные мАт клона 1А5 (Ж) той же концентрации ПО возрастает с 30 до 200 нг/мл. При снижении концентрации антител в два раза (в ТЗ₂ - З и Ж) предел обнаружения увеличивается со 150 до 200 нг/мл. При использовании низкоаффинных антител клона 1А5 (А) ТЗ₂ и ТЗ₃ имеют наибольшие пределы обнаружения. Напротив, для снижения ПО необходимо иммобилизовать аффинные антитела в большей концентрации. Так, повышение концентрации мАт клона 3G4 в ТЗ₃ (Б и В) приводит к снижению ПО с 150 до 80 нг/мл. Как ожидалось из математического описания ИХА с тремя ТЗ (см. раздел 3.5.1.2), предел обнаружения ТЗ определяется не только иммобилизованными в ней антителами, но аффинностями и концентрациями антител, иммобилизованных в предыдущих ТЗ (т.е. предел обнаружения

ТЗ₃ зависит от концентрации и аффинности антител в ТЗ₂ и ТЗ₁). При последовательном прохождении пробы по тест-полоске в первой зоне происходит связывание основной части двойных иммунных комплексов. Поэтому ТЗ₂ и ТЗ₃ достигает малые количества [ХВК – МЧ], что приводит к увеличению предела обнаружения аналита.

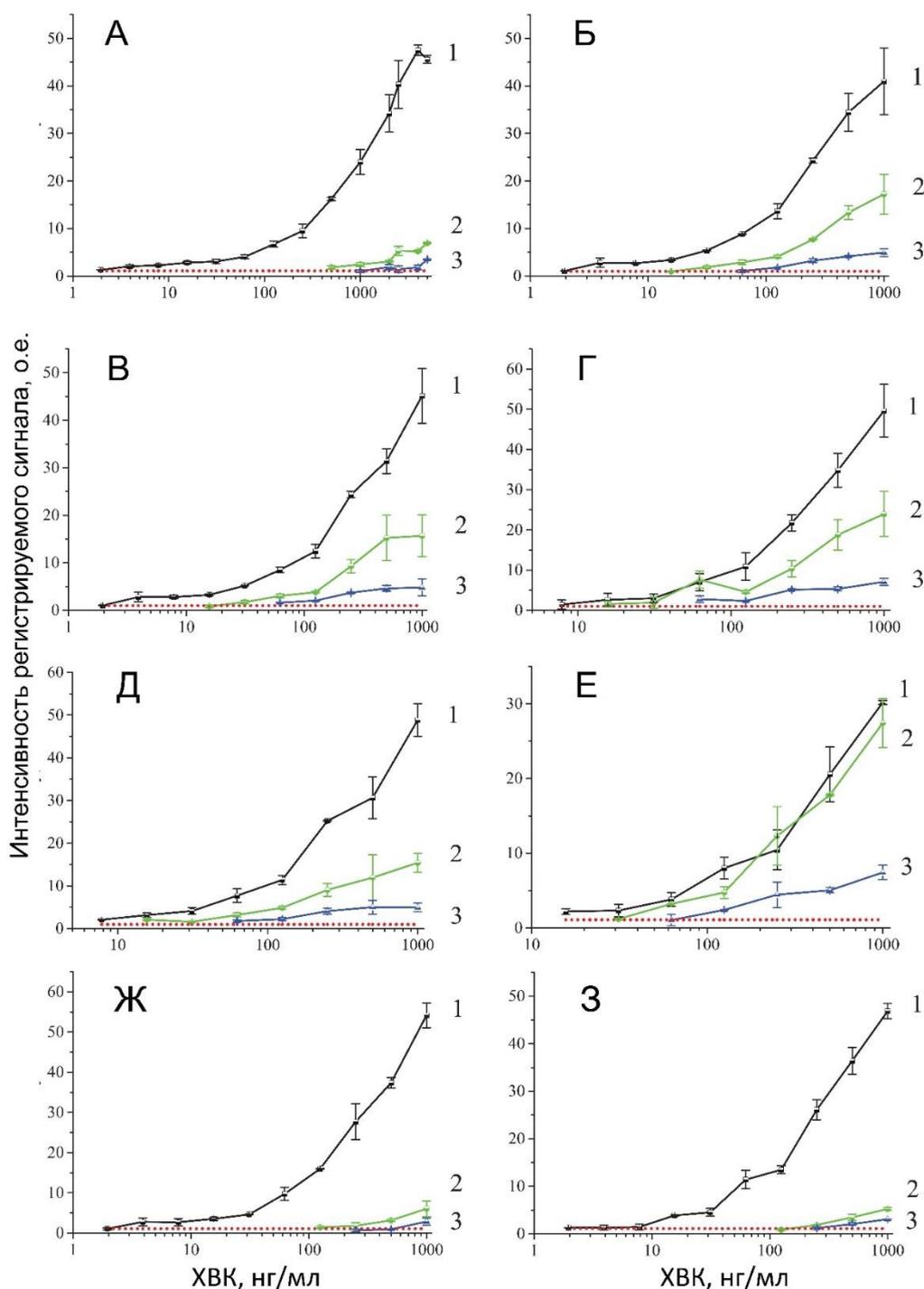


Рис. 66. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов для трех ТЗ от концентраций ХВК, полученные при разных условиях формирования ТЗ, представленных в табл. 14. Цифры 1, 2, 3 соответствуют ТЗ₁, ТЗ₂, ТЗ₃. Буквенные обозначения рисунков (от А до З) соответствуют обозначениям вариантов в табл. 14. n = 3

Для дальнейшего анализа использовали вариант Б (табл. 14), поскольку пределы обнаружения каждой зоны (3, 30 и 150 нг/мл ХВК для ТЗ₁, ТЗ₂, ТЗ₃, соответственно) связаны с выраженностью вирусной инфекции и позволяют идентифицировать:

- Здоровые растения (нет окрашенных ТЗ)
- Латентную инфекцию (окрашенная ТЗ₁)
- Подтвержденную вирусную инфекцию (окрашенные ТЗ₁ и ТЗ₂)
- Серьезную вирусную инфекцию (окрашенные ТЗ₁, ТЗ₂ и ТЗ₃)

Внешний вид тест-полосок после ИХА (вариант Б, табл. 14) представлен на рис.67.

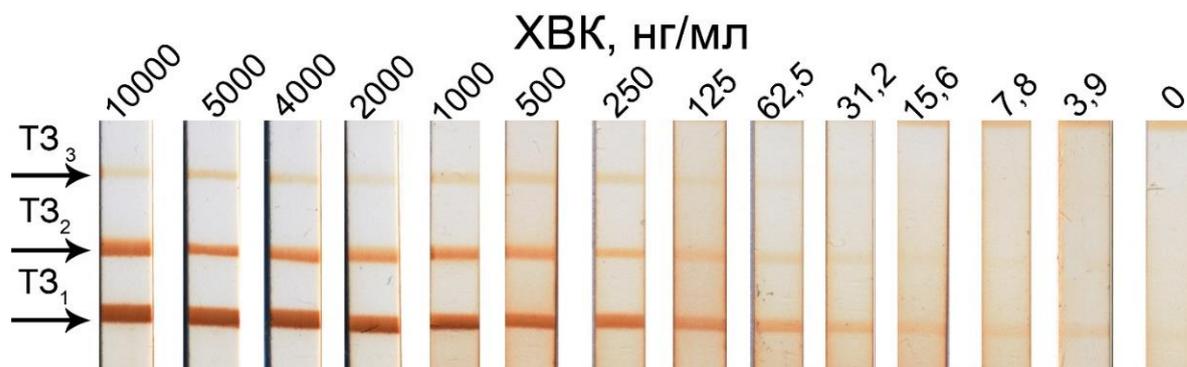


Рис. 67. Внешний вид тест-полосок после анализа ХВК в буфере

Разработанный мультипороговый формат ИХА позволяет проводить определение ХВК в диагностически важных диапазонах концентраций на основании визуального подсчета окрашенных зон.

3.5.1.4. Снижение предела обнаружения мультипорогового иммунохроматографического анализа

Использование в качестве маркера МЧ позволяет проводить магнитное концентрирование, удалять компоненты растительного матрикса и увеличивать концентрацию комплексов [ХВК – МЧ]. В работе использовали десятикратное магнитное концентрирование из экстракта листьев картофеля. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в ТЗ₁₋₃ от концентраций ХВК представлены на рис. 68.

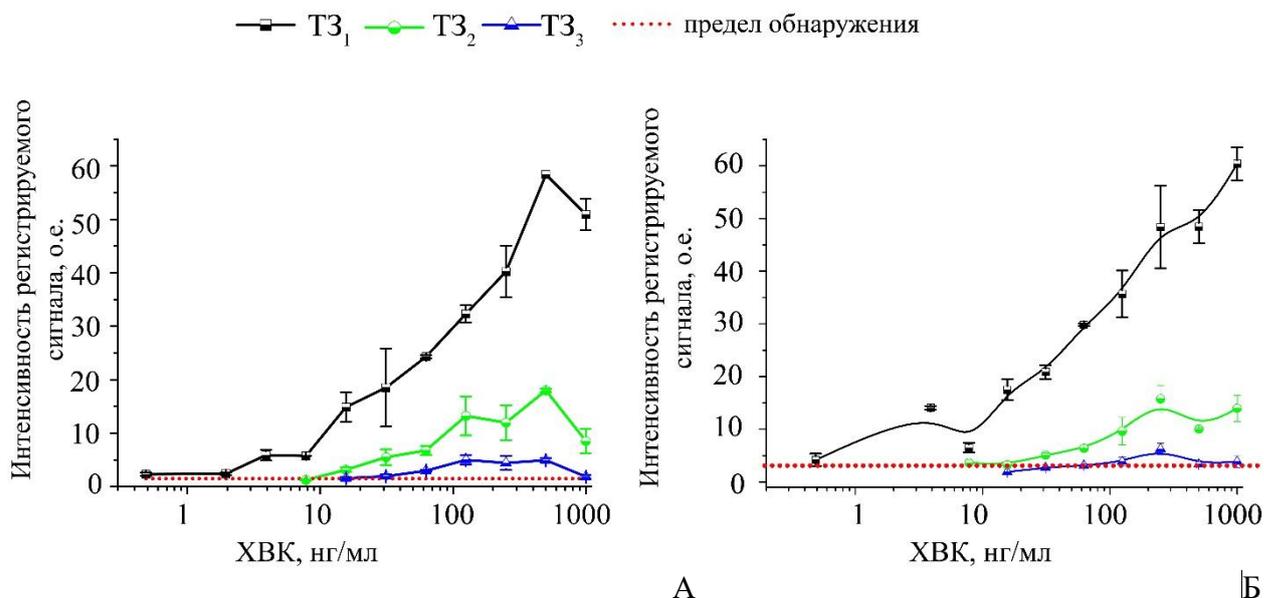


Рис. 68. Зависимости интенсивностей сигналов в тестовых зонах для ИХА ХВК с магнитным концентрированием. А – в буфере; Б – в экстракте листьев картофеля. n = 3

Магнитное концентрирование двойных иммунных комплексов [ХВК – МЧ] является дополнительным инструментом, позволяющим варьировать предел обнаружения всех трех тестовых зон. Кроме того, магнитное концентрирование позволяет снизить ПО всех трех ТЗ – 0,5; 8 и 30 нг/мл (в 6 раз для ТЗ₁; в 3,3 раза для ТЗ₂; в 5 раз для ТЗ₃). Кроме снижения предела обнаружения, магнитное концентрирование позволяет проводить ИХА в экстрактах листьев картофеля и нивелировать эффект компонентов матрикса.

3.5.2. Мультиплексный иммунохроматографический анализ

Предложено два формата мультиплексного ИХА. Первый формат основан на использовании одного конъюгата НЧЗ с адсорбированными антителами разной специфичности (мультиспецифичный конъюгат) и тест-полоски, содержащей смесь антител в тестовой зоне. Данный формат позволяет выявлять до пяти основных вирусных патогенов без их дифференцировки. ИХА с мультиспецифичным конъюгатом впервые реализован в диссертационной работе. Второй формат основан на формировании матрицы точечных тестовых зон на мембране и использовании смеси конъюгатов НЧЗ – Ат. Данный формат позволяет выявлять и дифференцировать до десяти основных фитопатогенов вирусной и бактериальной природы. Мультиточечное нанесение тестовых зон на нитроцеллюлозную мембрану было использовано ранее для определения фитопатогенов вирусной и бактериальной природы [129], наркотиков [126] и ряда других антигенов [6]. Увеличение количества определяемых антигенов и снижение пределов обнаружения являются перспективными направлениями для мультиточечного ИХА.

3.5.2.1. Иммунохроматографический анализ с мультиспецифичным конъюгатом

Для практических целей фитомониторинга первичной задачей является качественный анализ (присутствие/отсутствие вируса). Выявление как минимум одного из патогенов в пробе (например, в безвирусном посевном материале) оказывается достаточным основанием для принятия решения о качестве анализируемого материала. Таким образом, востребована система, позволяющая проводить качественный анализ основных вирусных патогенов без их дифференцировки. Нами предложен новый формат мультиплексного ИХА для определения общей вирусной зараженности с использованием мультиспецифичного конъюгата (характеристика конъюгата представлена в разделе 3.2.2).

В тестовую зону мембраны наносили смесь из пяти антител (рис. 69, 2). Концентрация каждого антитела составляла 0,5 мг/мл, общая концентрация иммобилизуемых антител – 2,5 мг/мл. При погружении тест-полоски в анализируемую пробу происходит формирование иммунных комплексов НЧЗ – Ат – вирус, их миграция по тест-полоске и концентрирование в тестовой зоне за счет связывания с иммобилизованными антителами. Избыток конъюгата взаимодействует в контрольной зоне с белком А (рис. 69, 3). Окрашивание тестовой зоны происходит в присутствии как минимум одного вируса в пробе. Такой подход позволяет проводить простое и быстрое визуальное определение общей вирусной зараженности во внелабораторных условиях.

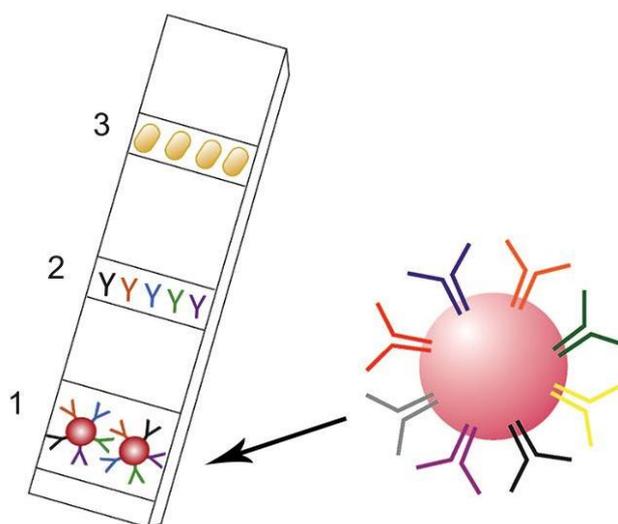


Рис. 69. Иммунохроматографическая тест-полоска с мультиспецифичным конъюгатом и смесью антител в тестовой зоне: 1 – мультиспецифичный конъюгат; 2 – смесь антител в тестовой зоне; 3 – контрольная зона с белком А

3.5.2.2. Оптимизация иммунохроматографического анализа с мультиспецифичным конъюгатом

Для оптимизации количества мультиспецифичного конъюгата его наносили на стекловолоконную мембрану в фиксированном объеме (1,6 мкл/мм), варьируя A_{520} от 3 до 5. Тест-полоски погружали в индивидуальные пробы вирусов (ХВК, МВК, SBK, YBK, ВСЛК, концентрация 50 нг/мл в ФБС-Т) и в буфер без вируса (отрицательная проба), после чего определяли интенсивность регистрируемого сигнала в тестовой зоне. Оптимальным A_{520} конъюгата считали значение, обеспечивающее максимальную интенсивность сигнала в тестовой зоне для проб с вирусом и отсутствие сигнала для отрицательной пробы. Полученные результаты показаны на рис. 70.

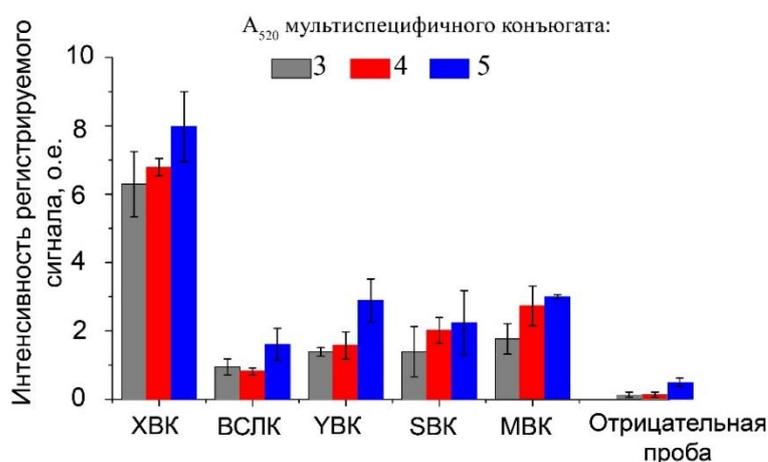


Рис. 70. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от A_{520} мультиспецифичного конъюгата для ИХА ХВК, МВК, SBK, YBK, ВСЛК (50 нг/мл) и отрицательной пробы. $n = 3$

Повышение A_{520} до 5 приводит к возникновению регистрируемого окрашивания для отрицательной пробы. Максимальное значение A_{520} , при котором не происходит неспецифичного окрашивания тестовой зоны для отрицательных проб, составляет 4.

Использование одного мультиспецифичного конъюгата имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием смеси моносспецифичных конъюгатов. Во-первых, мультиспецифичный конъюгат может быть использован для ИХА в большем количестве (A_{520}). Для смеси моносспецифичных конъюгатов количество конъюгата одной специфичности становится меньше. Так, количество моноконъюгата в смеси из пяти конъюгатов с $A_{520} = 4$ составляет 0,8. Малое количество конъюгата ограничивает ПО анализа. Для достижения сопоставимого с мультиспецифичным конъюгатом количества необходимо использовать смесь моносспецифичных конъюгатов с $A_{520} = 20$. Однако такая высокая оптическая плотность конъюгата вызывает фоновое окрашивание.

Для мультиспецифичного конъюгата вклад в колориметрический сигнал в тестовой зоне от одного вируса будут вносить все нанесенные частицы конъюгата в отличие от моноспецифичных, где из общей смеси вклад вносят только специфичные НЧЗ – Ат, а остальные неспецифичные моноконъюгаты мигрируют вдоль тест-полоски и связываются в контрольной зоне.

3.5.2.3. Использование иммунохроматографического анализа с мультиспецифичным конъюгатом для определения фитопатогенов

Предел обнаружения ИХА с мультиспецифичным конъюгатом устанавливали с помощью искусственно контаминированных проб (экстракт листьев картофеля, внесенная концентрация вирусов от 1000 до 1 нг/мл), содержащих только один вирус. Внешний вид тест-полосок и зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов от концентраций вирусов представлены на рис. 71 А, Б, соответственно.

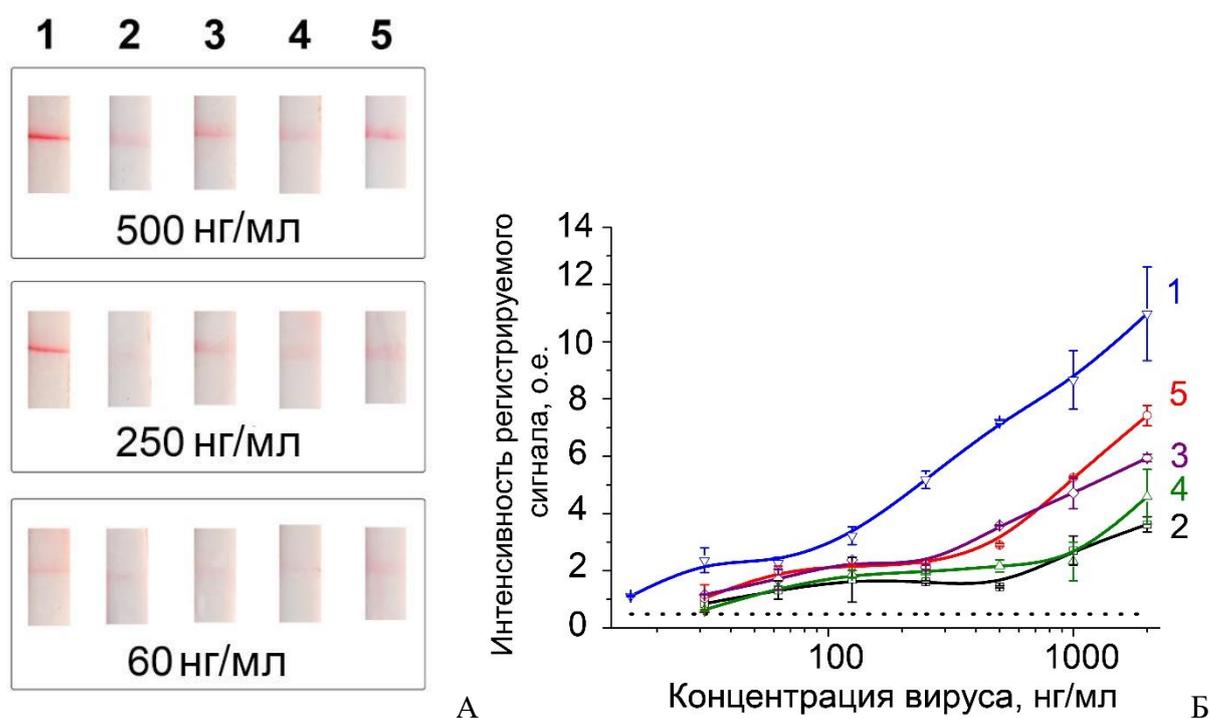


Рис. 71. ИХА с мультиспецифичным конъюгатом. А – внешний вид тест-полосок после анализа. Б – зависимости интенсивностей сигналов в тестовых зонах от концентраций вирусов: 1 – ХВК, 2 – ВСЛК, 3 – УВК, 4 – СВК, 5 – МВК. Пунктирная линия соответствует приборному пределу обнаружения. n = 3

Пределы обнаружений ИХА с мультиспецифичным конъюгатом составляет 10 нг/мл для ХВК и 30 нг/мл для МВК, СВК, УВК, ВСЛК. По разработанной тест-системы с мультиспецифичным конъюгатом оказываются в 2-4 раз выше по сравнению с

монотестами. Данный эффект объясняется меньшей концентрацией антител в тестовой зоне (0,5 и 1 мг/мл для мульти- и моно- ИХА, соответственно). Влияние концентрации антител в тестовой зоне на ее интенсивность окрашивания было показано нами ранее для *R. solanacearum* (см. раздел 3.3.3). Использование концентраций антител для ИХА с мультиспецифичным конъюгатом более 0,5 мг/мл (суммарная концентрация пяти антител более 2,5 мг/мл) приводит к появлению фона. Несмотря на незначительное увеличение пределов обнаружения, ИХА с мультиспецифичным конъюгатом позволяет существенно увеличить производительность скринингового анализа.

Для подтверждения возможности использования ИХА с мультиспецифичным конъюгатом проведен анализ 14 экстрактов листьев зараженного картофеля и 3 экстрактов листьев здорового картофеля. В качестве референсного метода использовали ИФА (табл. 15). Показано отсутствие ложноположительных результатов анализа для экстрактов 7, 8, 12. ИХА способен определять, как поражение одним вирусом (экстракты 1, 11, 17), так и смешанную инфекцию (экстракты 2-6, 9, 10, 13-16).

Табл. 15. Результаты ИХА с мультиспецифичным конъюгатом и ИФА экстрактов листьев картофеля

Экстракт	Результат ИХА с мультиспецифичным конъюгатом	Содержание вирусов, нг/мл (ИФА)				
		ХВК	ВСЛК	УВК	СВК	МВК
1	Зараженный	≥1000	-	-	-	-
2	Зараженный	≥1000	-	150	15	-
3	Зараженный	160	-	125	20	-
4	Зараженный	-	10	770	110	140
5	Зараженный	115	850	60	-	-
6	Зараженный	100	-	-	22	-
7	Здоровый	-	-	-	-	-
8	Здоровый	-	-	-	-	-
9	Зараженный	115	380	125	35	-
10	Зараженный	20	-	-	-	130
11	Зараженный	≥1000	-	-	-	-
12	Здоровый	-	-	-	-	-
13	Зараженный	≥1000	20	-	160	-
14	Зараженный	390	70	-	-	-
15	Зараженный	200	-	-	-	85
16	Зараженный	≥1000	125	-	230	-
17	Зараженный	-	-	-	-	80

3.5.2.4. Оптимизация мультиточечного иммунохроматографического анализа

Формирование массива тестовых зон в виде точек позволяет значительно увеличить количество тестовых зон на единицу площади рабочей мембраны. Изменение способа нанесения тестовых зон предполагает оптимизацию условий нанесения, обеспечивающих формирование тестовых зон округлой формы, не сливающихся друг с другом и однозначно идентифицируемых на мембране. Сливание тестовых зон обусловлено их близким расположением или слишком большим объемом наносимых реагентов.

На примере нанесения трех тестовых зон в виде точек (на тест-полоске шириной 5 мм) были выбраны условия, позволяющие четко дифференцировать каждую тестовую зону. Наносимый объем антител с концентрацией 1 мг/мл варьировали от 40 до 100 нл. Для визуализации тестовых зон использовали конъюгат НЧЗ с белком А с $A_{520} = 5$ (рис. 72).

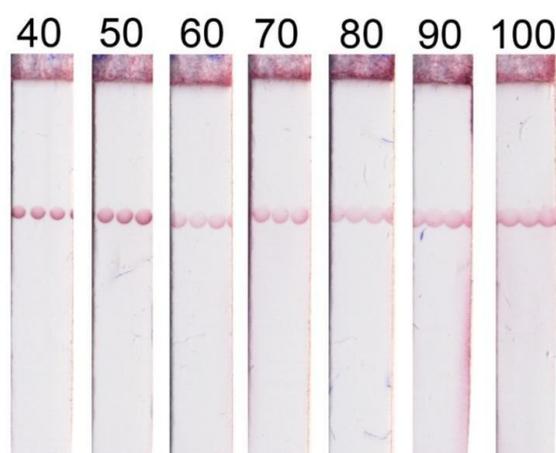


Рис. 72. Внешний вид тест-полосок с различным объемом нанесения антител в виде точек в тестовой зоне. Объем нанесения антител в (нл) указан над тест-полосками

При нанесении объема более 50 нл тестовые зоны сливаются и формируют линию. Для дифференцировки точек необходим объем нанесения около 40 нл (размер точечной тестовой линии около 300 мкм).

В работе также оптимизировали A_{520} смеси из 10 конъюгатов с равными объемами и оптической плотностью. При $A_{520} \geq 15$ наблюдалось высокое неспецифичное окрашивание (данные не представлены), которое нивелируется при снижении A_{520} до 12. Для достижения наименьшего предела обнаружения ИХА использовали A_{520} смеси конъюгатов, равное 12.

3.5.2.2. Предел обнаружения мультиплексного иммунохроматографического анализа

Для формирования тестовых зон на мембране использовали ПАТ, специфичные к патогенам картофеля вирусной и бактериальной природы. Схема формирования тестовых

зон представлена на рис. 9. Для определения предела обнаружения ИХА использовали буфер с внесенным известным количеством антигенов (вирусы от 500 до 0,1 нг/мл; бактерии от 10^8 до 10^2 кл./мл). Внешний вид тест-полосок после анализа представлен на рис. 73, зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций фитопатогенов – на рис. 74.

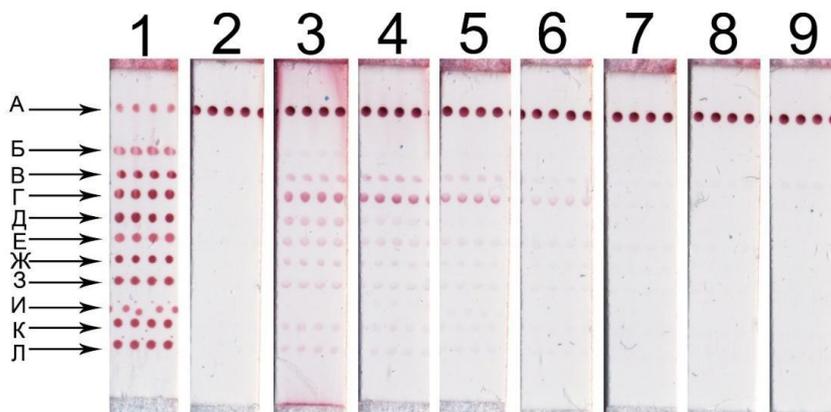


Рис. 73. Внешний вид иммунохроматографических тест-полосок после анализа фитопатогенов вирусной и бактериальной природы в различных концентрациях. 1 – тест-полоска с конъюгатом НЧЗ-белок А для визуализации положения тестовых и контрольной зон. 2 – отрицательный контроль. 3 – 10^8 кл./мл, 500 нг/мл. 4 – 10^7 кл./мл, 250 нг/мл. 5 – 10^6 кл./мл, 125 нг/мл. 6 – 10^5 кл./мл, 62,5 нг/мл. 7 – 10^4 кл./мл, 31,25 нг/мл. 8 – 10^3 кл./мл, 15,6 нг/мл. 9 – 10^2 кл./мл, 7,8 нг/мл. А - контрольная зона. Б – Л антитела в тестовых зонах против: Б – *P. atrosepticum*. В – *P. carotovorum*. Г – *C. michiganensis*, Д – *D. solani*, Е – ХВК. Ж – МВК, З – СВК, И – Y^O ВК, К – Y^N ВК, Л – ВСЛК

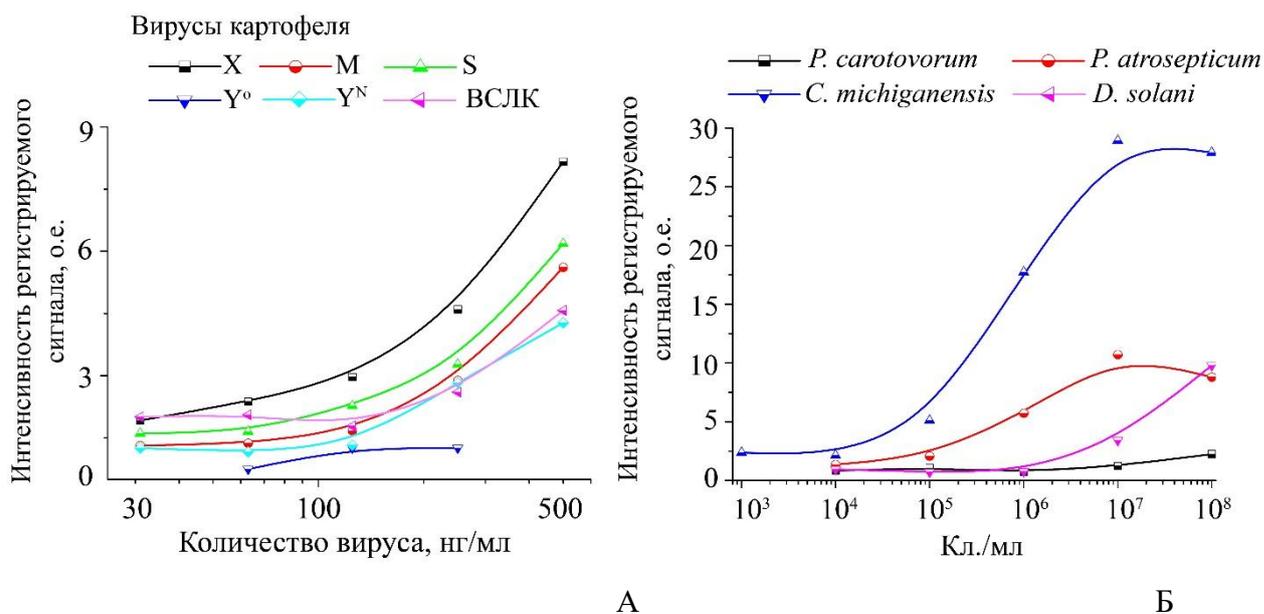


Рис. 74. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций фитопатогенов. А – для фитопатогенов вирусной природы. Б – для фитопатогенов бактериальной природы

Разработанный мультиплексный ИХА позволяет выявлять 10 основных фитопатогенов вирусной и бактериальной природы в рамках одного тестирования. ПО ХВК, МВК, СВК, Y^NВК и ВСЛК составляют 32 нг/мл, для Y^OВК – 64 нг/мл, *P. carotovorum* и *D. solani* – 10⁶ кл./мл, *P. atrosepticum* и *C. michiganensis* - 10⁴ и 10³ кл./мл. ПО мультиплексной тест-системы оказываются примерно на порядок больше по сравнению с монотестами. Данный эффект объясняется малым количеством конъюгата антител с НЧЗ: в мультиплексном ИХА A₅₂₀ = 1,2, что в 3-4 раза ниже по сравнению с моно ИХА – A₅₂₀=4-5 (табл. 8). Повышение оптической плотности в мультиплексном формате ИХА ограничено фоновым окрашиванием. Выбранные оптимальные условия не позволяют достигнуть низких ПО. Дальнейшее снижение ПО мультиплексного формата ИХА сопряжено с использованием дополнительных методических подходов.

Апробация и сравнение предложенных в настоящей работе трех типов усиления ИХА на примере монопараметрических тест-систем (см. табл. 13) показало, что для мультиплексного формата ИХА оптимальным является метод серебряного усиления. Методы, основанные на увеличении размера маркера, к которым относится метод серебряного усиления, не требуют изменения комплектации тест-систем и являются наиболее применимыми для мультиплексного ИХА. Метод серебряного усиления позволяет получить значительное увеличение интенсивности сигнала; кроме того, реакция восстановления серебра на тест-полоске может быть остановлена добавлением растворов, содержащих хлорид ионы. Поэтому для снижения ПО мультиплексного ИХА был выбран метод серебряного усиления, не требующий оптимизаций соотношения реагентов и способов введения метки.

Серебряное усиление проводили для тест-полосок, представленных на рис 73, нанесением растворов нитрата серебра и гидрохинона. Внешний вид тест-полосок после серебряного усиления показан на рис. 75. После серебряного усиления отмечается неспецифичное окрашивание тестовых зон в отрицательном контроле (рис. 75, тест-полоска 1) и при низких количествах антигена (рис. 75, тест-полоски 9-11). Однако данный фон не препятствует достоверной приборной регистрации сигнала тестовых зон для положительных проб.

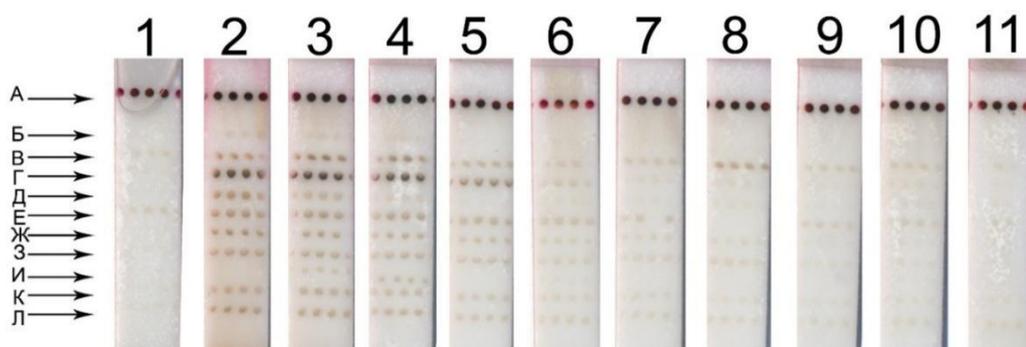


Рис. 75. Внешний вид тест-полосок после серебряного усиления. 1 – отрицательный контроль. 2 – 10^8 кл./мл, 500 нг/мл. 3 – 10^7 кл./мл, 250 нг/мл. 4 – 10^6 кл./мл, 125 нг/мл. 5 – 10^5 кл./мл, 62,5 нг/мл. 6 – 10^4 кл./мл, 31,25 нг/мл. 7 – 10^3 кл./мл, 15,6 нг/мл. 8 – 10^2 кл./мл, 7,8 нг/мл. 9 – 10 кл./мл, 3,9 нг/мл. 10 – 1 кл./мл, 1,95 нг/мл. 11 – 0,98 нг/мл. А-контрольная зона. Б – Л антитела в тестовых зонах против: Б – *P. atrosepticum*. В – *P. carotovorum*. Г – *S. michiganensis*. Д – *D. solani*. Е – ХВК. Ж – МВК. З – СВК. И – Y^O ВК. К – Y^N ВК. Л – ВСЛК

Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах после серебряного усиления представлены на рис. 76, а пределы обнаружения – в табл. 16. Серебряное усиление позволяет снизить ПО ХВК и ВСЛК в 16 раз, МВК, СВК, Y^N ВК в 8 раз, Y^O ВК в 7,5 раз, *P. carotovorum* и *D. solani* в 10 раз. Высокое неспецифичное окрашивание не позволяет снизить предел обнаружения для *P. atrosepticum* и *S. michiganensis*, однако существенное (более 5 раз) увеличение интенсивности окрашивания тестовых зон упрощает визуальную регистрацию результатов анализа.

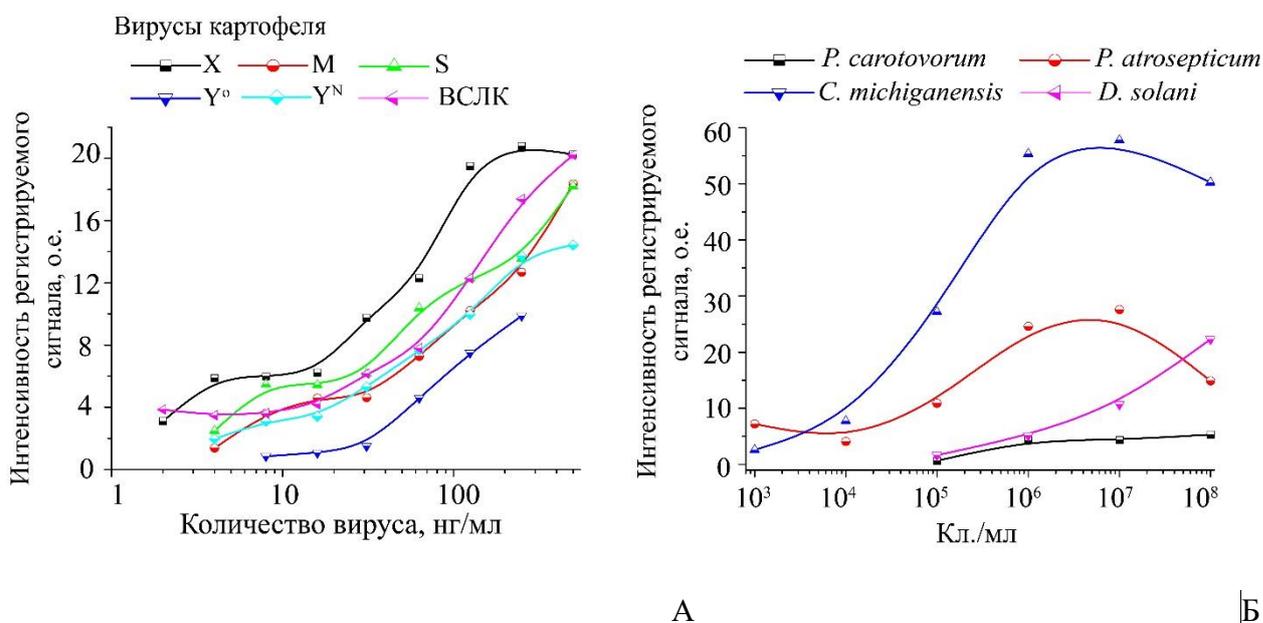


Рис. 76. Зависимости интенсивностей регистрируемых сигналов в тестовых зонах от концентраций фитопатогенов после серебряного усиления. А – для фитопатогенов вирусной природы. Б – для фитопатогенов бактериальной природы

Табл. 16. Пределы обнаружения мультиплексного ИХА до и после серебряного усиления

Аналит	Предел обнаружения ИХА без усиления, нг/мл, кл./мл	Предел обнаружения ИХА с усилением, нг/мл, кл./мл
ХВК	32	2
МВК	32	4
SBK	32	4
Y ^O ВК	64	8
Y ^N ВК	32	4
ВСЛК	32	2
<i>P. carotovorum</i>	10 ⁶	10 ⁵
<i>P. atrosepticum</i>	10 ⁴	10 ⁴
<i>C. michiganensis</i>	10 ³	10 ³
<i>D.solani</i>	10 ⁶	10 ⁵

Достигнутые низкие пределы обнаружения ХВК, МВК, SBK, Y^NВК, ВСЛК позволяют использовать данную тест-систему для диагностики латентной вирусной инфекции.

3.6. Апробация и верификация тест-систем и подходов для снижения предела обнаружения

Разработанные моно - и мультиплексные тест-системы были апробированы на репрезентативной панели проб (более 300 зараженных и здоровых растений из различных регионов РФ). Апробация проведена совместно с ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (к.б.н. Варицев Ю.А., к.б.н. Зайцев И.А.) и Всероссийским центром карантина растений (к.б.н. Дренова Н.В.). В качестве референсных методов использовали коммерческие ИФА и ИХА наборы. Показана высокая корреляция количественных результатов всех разработанных иммунохроматографических тест-систем.

На рис. 77 представлено сопоставление количественных результатов разработанной тест-системы для определения ХВК с амплификацией ЦФ и коммерческого набора для ИФА («Bioreba», Швейцария). Показана высокая корреляция количественных результатов анализа. Аналогичные эксперименты были выполнены для всех использованных в работе фитопатогенов.

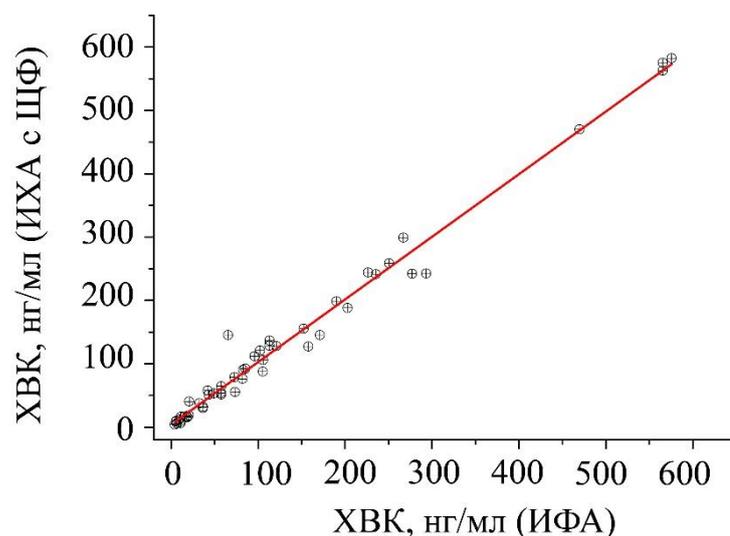


Рис. 77. Корреляция количественных результатов коммерческого ИФА и разработанного ИХА с ЩФ ($R^2=0,98$)

ИХА с мультиспецифичным конъюгатом показал 100%-ную корреляцию результатов с ИФА и коммерческими иммунохроматографическими тестами («Bioreba», Швейцария). Мультиплексный точечный ИХА определяет фитопатогены во всех зараженных растениях. Ложноположительных результатов анализа не наблюдалось.

Показана высокая специфичность тест-систем. Так, при контроле бактериальных фитопатогенов продемонстрировано отсутствие ложноположительных результатов для близкородственных бактерий (18 штаммов). Методом ПЦР подтверждено, что определяемый антиген является *R. solanacearum* биовар 2.

Для всех разработанных тест-систем показан низкий процент ложноположительных результатов анализа (менее 1 %). Достигнутые пределы обнаружения позволяют определять фитопатогены вирусной и бактериальной природы в низких концентрациях. Количественные и качественные результаты подтверждены с использованием молекулярно-генетических и иммунохимических методов. Предложенные в работе форматы анализа и решения для снижения пределов обнаружения являются перспективными для практического применения во внелабораторных условиях.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать следующие 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 мультипоровом 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 литературы

1. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009. Vol. 393, № 2. P. 569–582.
2. Patris S., Vandeput M., Kauffmann J.-M. Antibodies as target for affinity biosensors // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 79. P. 239–246.
3. Rivas L., Medina-Sanchez M., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. Improving sensitivity of gold nanoparticle-based lateral flow assays by using wax-printed pillars as delay barriers of microfluidics // *Lab on a Chip*. 2014. Vol. 14, № 22. P. 4406–4414.
4. Han S., Zhou T., Yin B., He P. A sensitive and semi-quantitative method for determination of multi-drug residues in animal body fluids using multiplex dipstick immunoassay // *Analytica Chimica Acta*. 2016. Vol. 927. P. 64–71.
5. Quesada-González D., Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. Vol. 73. P. 47–63.
6. Li J., Macdonald J. Multiplexed lateral flow biosensors: Technological advances for radically improving point-of-care diagnoses // *Biosensors and Bioelectronics*. 2016. Vol. 83. P. 177–192.
7. Goryacheva I.Y., Lenain P., De Saeger S. Nanosized labels for rapid immunotests // *Trends in Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 46. P. 30–43.
8. Vuento M., Paananen K., Vihinen-Ranta M., Kurppa A. Characterization of antigenic epitopes of potato virus Y // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993. Vol. 1162, № 1–2. P. 155–160.
9. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annual Review of Biochemistry*. 2002. Vol. 71, № 1. P. 635–700.
10. Bahadır E.B., Sezgintürk M.K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 82. P. 286–306.
11. Fridley G.E., Holstein C.A., Oza S.B., Yager P. The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays // *MRS Bull.* 2013. Vol. 38, № 4. P. 326–330.
12. Li J., McMillan D., Macdonald J. Enhanced detection efficiency of plastic scintillators upon incorporation of zirconia nanoparticles // *Sensors and Materials*. 2015. Vol. 27, № 7. P. 549–561.

13. Chen C., Wu J. A Fast and sensitive quantitative lateral flow immunoassay for Cry1Ab based on a novel signal amplification conjugate // *Sensors*. 2012. Vol. 12, № 9. P. 11684–11696.
14. Li Y.-F. et al. Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review // *Trends in Analytical Chemistry*. 2017. Vol. 88. P. 25–40.
15. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis // *Trends in Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 55. P. 81–93.
16. Sajid M., Kawde A.-N., Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review // *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015. Vol. 19, № 6. P. 689–705.
17. Hodgetts J. et al. Development of a lateral flow device for in-field detection and evaluation of PCR-based diagnostic methods for *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, the causal agent of banana xanthomonas wilt // *Plant Pathology*. 2015. Vol. 64, № 3. P. 559–567
18. Khater M., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. Biosensors for plant pathogen detection // *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. Vol. 93. P. 72–86.
19. Mak W.C., Beni V., Turner A.P.F. Lateral-flow technology: From visual to instrumental // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 79. P. 297–305.
20. Zherdev A.V, Dzantiev B.B. Ways to reach lower detection limits of lateral flow immunoassays // *Rapid test - advances in design, format and diagnostic applications*. ed. Laura Anfossi. IntechOpen. 2018. P. 9-43.
21. Ye H., Xia X. Enhancing the sensitivity of colorimetric lateral flow assay (CLFA) through signal amplification techniques // *Journal of Materials Chemistry B*. 2018. Vol. 6, № 44. P. 7102–7111.
22. Ren W., Cho I., Zhou Z., Irudayaraj J. Ultrasensitive detection of microbial cells using magnetic focus enhanced lateral flow sensors // *Chemical Communications*. 2016. Vol. 52, № 27. P. 4930–4933.
23. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. Vol. 403, № 6. P. 1595–1605.
24. Liu D. et al. A modified lateral flow immunoassay for the detection of trace aflatoxin M1 based on immunomagnetic nanobeads with different antibody concentrations // *Food*

Control. 2015. Vol. 51. P. 218–224.

25. Linares E.M., Kubota L.T., Michaelis J., Thalhammer S. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: Evaluation and comparison of bioconjugates // *Journal of Immunological Methods*. 2012. Vol. 375, № 1–2. P. 264–270.

26. Zhang D., Liu Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection // *Biosensors and Bioelectronics*. 2016. Vol. 75. P. 273–284.

27. Gong X. et al. A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips // *Journal of Materials Chemistry B*. 2017. Vol. 5, № 26. P. 5079–5091.

28. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ‘Traffic light’ immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk // *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. Vol. 63. P. 255–261.

29. Álvarez-Diduk R., Orozco J., Merkoçi A. Paper strip-embedded graphene quantum dots: a screening device with a smartphone readout // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 976.

30. Sakurai A. et al. Fluorescent immunochromatography for rapid and sensitive typing of seasonal influenza viruses // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 2. e0116715.

31. Chen Y. et al. Near-infrared fluorescence-based multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four antibiotic residue families in milk // *Biosensors and Bioelectronics*. 2016. Vol. 79. P. 430–434.

32. Yetisen A.K., Akram M.S., Lowe C.R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices // *Lab on a Chip*. 2013. Vol. 13, № 12. P. 2210–2251.

33. Урусов А.Е., Петракова А.Е., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение магнитных наночастиц в иммуноанализе // *Российские нанотехнологии*. 2017. Т. 12, № 9–10. С. 3–13.

34. Yan J. et al. Effect of physiochemical property of Fe₃O₄ particle on magnetic lateral flow immunochromatographic assay // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014. Vol. 197. P. 129–136

35. de Puig H., Bosch I., Gehrke L., Hamad-Schifferli K. Challenges of the nano–bio interface in lateral flow and dipstick immunoassays // *Trends in Biotechnology*. 2017. Vol. 35, № 12. P. 1169–1180.

36. Qian S., Bau H.H. A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays // *Analytical Biochemistry*. 2003. Vol. 322, № 1. P. 89–98.
37. Xing C., Liu L., Song S., Feng M., Kuang H., Xu C. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water // *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. Vol. 66. P. 445–453
38. Liu R., Zhang Y., Zhang S., Qiu S., Gao Y. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative // *Applied Spectroscopy Reviews*. 2014. Vol. 49, № 2. P. 121–138.
39. Zhou Y, Ding L., Wu Y., Huang X., Lai W., Xiong Y. Emerging strategies to develop sensitive AuNP-based ICTS nanosensors // *Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 112. P. 147–160.
40. Omidfar K., Khorsand F., Darziani Azizi M. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors // *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. Vol. 43, № 1. P. 336–347
41. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007. Vol. 58, № 1. P. 3–7.
42. de Puig H., Tam J. O., Yen C., Gehrke L., Hamad-Schifferli K. Extinction coefficient of gold nanostars // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2015. Vol. 119, № 30. P. 17408–17415.
43. Dolinnyi A.I. Extinction coefficients of gold nanoparticles and their dimers. Dependence of optical factor on particle size // *Colloid Journal*. 2017. Vol. 79, № 5. P. 611–620.
44. Cui X., Huang Y., Wang J., Zhang L., Rong Y., Lai W., Chen T. A remarkable sensitivity enhancement in a gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5, № 56. P. 45092–45097.
45. Serebrennikova K., Samsonova J., Osipov A. Hierarchical nanogold labels to improve the sensitivity of lateral flow immunoassay // *Nano-Micro Letters*. 2018. Vol. 10. № 24.
46. Ji Y. et al. Detection of aflatoxin B1 with immunochromatographic test strips: Enhanced signal sensitivity using gold nanoflowers // *Talanta*. 2015. Vol. 142. P. 206–212.
47. Zhang L., Huang Y., Wang J., Rong Y., Lai W., Zhang J., Chen T. Hierarchical flowerlike gold nanoparticles labeled immunochromatography test strip for highly sensitive

detection of *Escherichia coli* O157:H7 // *Langmuir*. 2015. Vol. 31, № 19. P. 5537–5544.

48. Di Nardo F. et al. Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single test line // *Talanta*. 2019. Vol. 192. P. 288–294.

49. Anfossi L. et al. Silver and gold nanoparticles as multi-chromatic lateral flow assay probes for the detection of food allergens // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018. doi: 10.1007/s00216-018-1451-6

50. Xianyu Y., Wang Q., Chen Y. Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing // *Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 106. P. 213–224.

51. Xiao D., Lu T. Zeng R., Bi Y. Preparation and highlighted applications of magnetic microparticles and nanoparticles: a review on recent advances // *Microchimica Acta*. 2016. Vol. 183. № 10. P. 2655-2675.

52. Li Q. et al. A rapid and highly sensitive protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on immunochromatography assay combined with the enrichment technique of immunomagnetic nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. 2011. Vol. 6. P. 3033-3039.

53. Liu F. et al. Highly sensitive and selective lateral flow immunoassay based on magnetic nanoparticles for quantitative detection of carcinoembryonic antigen // *Talanta*. 2016. Vol. 161. P. 205–210.

54. Smith A.M., Nie S. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. // *Analyst*. 2004. Vol. 129, № 8. P. 672–677.

55. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // *Nature Materials*. 2005. Vol. 4, № 6. P. 435–446.

56. Foubert A. et al. Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 83. P. 31–48.

57. Taranova N.A., Berlina A.N., Semeykina A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Comparative characteristics of nanodisperse labels for immunochromatographic test systems // *Nano Hybrids and Composites*. 2017. Vol. 13. P. 32–38.

58. Goryacheva I.Y., Sapelkin A. V., Sukhorukov G.B. Carbon nanodots: Mechanisms of photoluminescence and principles of application // *Trends in Analytical Chemistry*. 2017. Vol. 90. P. 27–37.

59. Wu Z.L., Liu Z.X., Yuan Y.H. Carbon dots: materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission // *Journal of Materials Chemistry B*. 2017. Vol. 5, № 21. P. 3794–3809.
60. Jaiswal A., Ghosh S.S., Chattopadhyay A. One step synthesis of C-dots by microwave mediated caramelization of poly(ethylene glycol) // *Chemical Communication*. 2012. Vol. 48, № 3. P. 407–409.
61. Peng H. et al. Tuning the properties of luminescent nitrogen-doped carbon dots by reaction precursors // *Carbon*. 2016. Vol. 100. P. 386–394.
62. Shi L. et al. Carbon dots with high fluorescence quantum yield: the fluorescence originates from organic fluorophores // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, № 30. P. 14374–14378.
63. Zhu S., Zhao X., Song Y., Lu S., Yang B. Beyond bottom-up carbon nanodots: Citric-acid derived organic molecules // *Nano Today*. 2016. Vol. 11, № 2. P. 128–132.
64. Kokorina A.A. et al. Dispersion of optical and structural properties in gel column separated carbon nanoparticles // *Carbon*. 2018. Vol. 127. P. 541–547.
65. Johnson S., Cushion M., Bond S., Godbert S., Pike J. Comparison of analytical sensitivity and women's interpretation of home pregnancy tests // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2015. Vol. 53, № 3. P. 391–402.
66. McDonald C.J., Devon M.J. Hollow latex particles: synthesis and applications // *Advances in Colloid and Interface Science* 2002. Vol. 99, № 3. P. 181–213.
67. Lee S., Mehta S., Erickson D. Two-color lateral flow assay for multiplex detection of causative agents behind acute febrile illnesses // *Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 88, № 17. P. 8359–8363.
68. Mao X., Wang W., Du T.E. Dry-reagent nucleic acid biosensor based on blue dye doped latex beads and lateral flow strip // *Talanta*. 2013. Vol. 114. P. 248–253.
69. Wu J. et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II) // *Chemical Society Reviews*. 2019. Vol. 48, № 4. P. 1004–1076.
70. Parolo C., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes // *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. Vol. 40, № 1. P. 412–416.
71. Wang Z., Duan N., Li J., Ye J., Ma S., Le G. Ultrasensitive chemiluminescent

immunoassay of *Salmonella* with silver enhancement of nanogold labels // *Luminescence*. 2011. Vol. 26, № 2. P. 136–141.

72. Lucas-Garrote B., Morais S., Maquieira Á. Dual signal amplification for highly sensitive hybridization microassays on chemically activated surfaces // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017. Vol. 246. P. 1108–1115.

73. Seopsi L. Larsson, L.I., Bastholm, L. Nielsen, M. Hartvig Nielsen. Silver-enhanced colloidal gold probes as markers for scanning electron microscopy // *Histochemistry*. 1986. Vol. 86, № 1. P. 35–41.

74. Yang W. et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a // *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. Vol. 26, № 8. P. 3710–3713.

75. Gupta S., Huda S., Kilpatrick P.K., Velez O.D. Characterization and optimization of gold nanoparticle-based silver-enhanced immunoassays // *Analytical Chemistry*. 2007. Vol. 79, № 10. P. 3810–3820.

76. Yu Q. et al. Gold nanoparticles-based lateral flow immunoassay with silver staining for simultaneous detection of fumonisin B1 and deoxynivalenol // *Food Control*. 2015. Vol. 54. P. 347–352.

77. Xing C. et al. A silver enhanced and sensitive strip sensor for Cadmium detection // *Food and Agricultural Immunology*. 2014. Vol. 25, № 2. P. 287–300.

78. Drygin Y.F. et al. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 93, № 1. P. 179–189.

79. Бызова Н.А., Жердев А.В., Свешников П.Г., Садыхов Э.Г., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции антигенов *Helicobacter pylori* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. В. 51, № 5. С. 520-530.

80. Anfossi L., Di Nardo F., Giovannoli C., Passini C., Baggiani C. Increased sensitivity of lateral flow immunoassay for ochratoxin A through silver enhancement // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. Vol. 405, № 30. P. 9859–9867.

81. Rodríguez M.O., Covian L.B., Garcia A.C., Blanco-Lopez M.C. Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays // *Talanta*. 2016. Vol. 148. P. 272–278.

82. Lan M., Guo Y., Zhao Y., Liu Y., Gui W., Zhu G. Multi-residue detection of pesticides using a sensitive immunochip assay based on nanogold enhancement // *Analytica*

Chimica Acta. 2016. Vol. 938. P. 146–155.

83. Dias J.T., Svedberg G., Nystrand M., Andersson-Svahn H., Ganelius J. Rapid signal enhancement method for nanoprobe-based biosensing // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 6837.

84. Wang X., Niessner R., Knopp D. Controlled growth of immunogold for amplified optical detection of aflatoxin B1 // *Analyst.* 2015. Vol. 140, № 5. P. 1453–1458.

85. Zhang Z. et al. Plasmonic colorimetric sensors based on etching and growth of noble metal nanoparticles: Strategies and applications // *Biosensors and Bioelectronics.* 2018. Vol. 114. P. 52–65.

86. Newman J.D.S., Blanchard G.J. Formation of gold nanoparticles using amine reducing agents // *Langmuir.* 2006. Vol. 22, № 13. P. 5882–5887.

87. Bu T. et al. Ultra technically-simple and sensitive detection for *Salmonella enteritidis* by immunochromatographic assay based on gold growth // *Food Control.* 2018. Vol. 84. P. 536–543.

88. Wang Q., Wei H., Zhang Z., Wang E., Dong S. Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay // *Trends in Analytical Chemistry.* 2018. Vol. 105. P. 218–224.

89. Peng F.F., Zhang Y., Gu N. Size-dependent peroxidase-like catalytic activity of Fe₃O₄ nanoparticles // *Chinese Chemical Letters.* 2008. Vol. 19, № 6. P. 730–733.

90. Asati M.A. et al. Oxidase activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. // *Angewandte Chemie.* 2009. Vol. 48, № 13. P. 2308–2312.

91. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Catalytically synthesized prussian blue nanoparticles defeating natural enzyme peroxidase // *Journal of the American Chemical Society.* 2018. Vol. 140, № 36. P. 11302–11307.

92. Zhao B. et al. Prussian blue nanoparticles based lateral flow assay for high sensitive determination of clenbuterol // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2018. Vol. 275. P. 223–229.

93. Loynachan C.N. et al. Platinum nanocatalyst amplification: redefining the gold standard for lateral flow immunoassays with ultrabroad dynamic range // *ACS Nano.* 2018. Vol. 12, № 1. P. 279–288.

94. Zhang L. et al. Ultrasensitive detection of viable *Enterobacter sakazakii* by a continual cascade nanozyme biosensor // *Analytical Chemistry.* 2017. Vol. 89, № 19. P. 10194–

10200.

95. Duan D. et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola // *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. Vol. 74. P. 134–141.

96. Gao L. et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles // *Nature Nanotechnology*. 2007. Vol. 2, № 9. P. 577–583.

97. Zuk R.F. et al. Enzyme immunochromatography-A quantitative immunoassay requiring no instrumentation // *Clinical Chemistry*. 1985. Vol. 31, № 7. P. 1144–1150.

98. Cho J.-H., Paek E.-H., Cho I.-H., Paek S.-H. An enzyme immunoanalytical system based on sequential cross-flow chromatography // *Analytical Chemistry*. 2005. Vol. 77, № 13. P. 4091–4097.

99. Sheldon E.L., Kellogg D.E., Watson R., Levenson C.H., Erlich H.A. Use of nonisotopic M13 probes for genetic analysis: application to HLA class II loci. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986. Vol. 83, № 23. P. 9085–9089.

100. Samsonova J. V., Safronova V.A., Osipov A.P. Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk // *Talanta*. 2015. Vol. 132. P. 685–689.

101. Cho I.-H., Bhunia A., Irudayaraj J. Rapid pathogen detection by lateral-flow immunochromatographic assay with gold nanoparticle-assisted enzyme signal amplification. // *International journal of food microbiology*. 2015. Vol. 206. P. 60–66.

102. Santivañez S.J. et al. Evaluation of a new immunochromatographic test using recombinant antigen b8/1 for diagnosis of cystic echinococcosis // *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 53, № 12. P. 3859–3863.

103. Endo F. et al. Development of a simple and quick immunochromatography method for detection of anti-HPV-16/-18 antibodies // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 2. e0171314.

104. P.Preechakasedki et al. Development of an automated wax-printed paper-based lateral flow device for alpha-fetoprotein enzyme-linked immunosorbent assay // *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 102. P. 27-32

105. Lathwal S., Sikes H.D. Assessment of colorimetric amplification methods in a paper-based immunoassay for diagnosis of malaria // *Lab on a Chip*. 2016. Vol. 16, № 8. P. 1374–1382.

106. Iyer P. V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment // *Process Biochemistry*. 2008. Vol. 43, № 10. P. 1019–1032.
107. Mateo C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. Vol. 40, № 6. P. 1451–1463.
108. Ramachandran S., Fu S., Lutz B., Yager P. Long-term dry storage of an enzyme-based reagent system for ELISA in point-of-care devices // *Analyst*. 2014. Vol. 139, № 6. P. 1456.
109. Crowe L.M., Reid D.S., Crowe J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? // *Biophysical Journal*. 1996. Vol. 71, № 4. P. 2087–2093.
110. Taranova N.A., Urusov A.E., Sadykhov E.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Bifunctional gold nanoparticles as an agglomeration-enhancing tool for highly sensitive lateral flow tests: a case study with procalcitonin // *Microchimica Acta*. 2017. Vol. 184, № 10. P. 4189–4195.
111. Chen M. et al. Dual gold nanoparticle lateflow immunoassay for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 // *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 876. P. 71–76.
112. Zhong Y. et al. Gold nanoparticles based lateral flow immunoassay with largely amplified sensitivity for rapid melamine screening // *Microchimica Acta*. 2016. Vol. 183, № 6. P. 1989–1994.
113. Toubanaki D.K., Margaroni M., Karagouni E. Dual enhancement with a nanoparticle-based lateral flow biosensor for the determination of DNA // *Analytical Letters*. 2015. Vol. 49, № 7. P. 1040-1055.
114. Choi D.H. et al. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I // *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. Vol. 25, № 8. P. 1999–2002.
115. Song X. et al. Development of fluorescence-based liposome immunoassay for detection of *Cronobacter muytjensii* in pure culture // *Current Microbiology*. 2015. Vol. 70, № 2. P. 246–252
116. Edwards K.A., Baeumner A.J. Liposomes in analyses // *Talanta*. 2006. Vol. 68, № 5. P. 1421–1431.
117. Edwards K.A., Baeumner A.J. Optimization of DNA-tagged dye-encapsulating liposomes for lateral-flow assays based on sandwich hybridization // *Analytical and Bioanalytical*

Chemistry. 2006. Vol. 386, № 5. P. 1335–1343.

118. Edwards K.A., Baeumner A.J. Enhancement of heterogeneous assays using fluorescent magnetic liposomes // *Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 86, № 13. P. 6610–6616.

119. Annie Ho J., Wu L.-C., Chang L.-H., Hwang K.-C., Reuben Hwu J.-R. Liposome-based immunoaffinity chromatographic assay for the quantitation of immunoglobulin E in human serum // *Journal of Chromatography B*. 2010. Vol. 878, № 2. P. 172–176.

120. Shukla S., Leem H., Kim M. Development of a liposome-based immunochromatographic strip assay for the detection of *Salmonella* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. Vol. 401, № 8. P. 2581–2590.

121. Chapman R. et al. Multivalent nanoparticle networks enable point-of-care detection of human phospholipase-A2 in serum // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, № 3. P. 2565–2573.

122. Dincer C., Bruch R., Kling A., Dittrich P.S., Urban G.A. Multiplexed point-of-care testing - xPOCT // *Trends in Biotechnology*. 2017. Vol. 35, № 8. P. 728–742.

123. Zhang X. et al. Multiplex lateral flow immunoassays based on amorphous carbon nanoparticles for detecting three *Fusarium* mycotoxins in maize // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017. Vol. 65, № 36. P. 8063–8071.

124. Gantelius J., Bass T., Sjoberg R., Nilsson P., Andersson-Svahn H. A lateral flow protein microarray for rapid and sensitive antibody assays // *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. Vol. 12, № 11. P. 7748–7759.

125. Kong D. et al. A gold nanoparticle-based semi-quantitative and quantitative ultrasensitive paper sensor for the detection of twenty mycotoxins // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, № 9. P. 5245–5253.

126. Taranova N.A. et al. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse // *Microchimica Acta*. 2013. Vol. 180, № 11–12. P. 1165–1172.

127. Papanikos F. et al. Lateral flow dipstick test for genotyping of 15 beta-globin gene (HBB) mutations with naked-eye detection // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 727. P. 61–66.

128. Elenis D.S., Ioannou P.C., Christopoulos T.K. A nanoparticle-based sensor for visual detection of multiple mutations // *Nanotechnology*. 2011. Vol. 22, № 15. № 155501

129. Safenkova I.V. et al. Multiarray on a test strip (MATS): rapid multiplex

immunodetection of priority potato pathogens // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016. Vol. 408, № 22. P. 6009–6017.

130. Fu E. Enabling robust quantitative readout in an equipment-free model of device development // *Analyst*. 2014. Vol. 139, № 19. P. 4750–4757.

131. Law W.T. et al. Whole-blood test for total cholesterol by a self-metering, self-timing disposable device with built-in quality control // *Clinical Chemistry*. 1997. Vol. 43, № 2. P. 384–390.

132. Vaughan L.M. et al. Multicentre evaluation of disposable preparation visually theophylline // *The Lancet*. 1985. Vol. 327, № 8474. P. 184–186.

133. Lou S.C., Patel C., Ching S., Gordon J. One-step competitive immunochromatographic assay for semiquantitative determination of lipoprotein(a) in plasma // *Clinical Chemistry*. 1993. Vol. 39, № 4. P. 619–624.

134. Bühner-Sekula S., Hamerlinck F.F.V., Out T.A., Bordewijk L.G., Klatser P.R. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera // *Journal of Immunological Methods*. 2000. Vol. 238, № 1–2. P. 55–58.

135. Yin H.-Y., Chu P.-T., Tsai W.-C., Wen H.-W. Development of a barcode-style lateral flow immunoassay for the rapid semi-quantification of gliadin in foods // *Food Chemistry*. 2016. Vol. 192. P. 934–942.

136. Leung W. et al. InfectCheck CRP barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections // *Journal of Immunological Methods*. 2008. Vol. 336, № 1. P. 30–36.

137. Bos L. Crop losses caused by viruses // *Crop Prot.* 1982. Vol. 1, № 3. P. 263–282.

138. Lamichhane J.R., Bartoli C. Plant pathogenic bacteria in open irrigation systems: what risk for crop health? // *Plant Pathology*. 2015. Vol. 64, № 4. P. 757–766.

139. Mehle N., Ravnkar M. Plant viruses in aqueous environment - Survival, water mediated transmission and detection // *Water Research*. 2012. Vol. 46, № 16. P. 4902–4917.

140. Анисимов Б.В. Вирусные болезни и их контроль в семеноводстве картофеля // *Защита и карантин растений*. 2012. № 5. С. 12–18.

141. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes / ed. Loebenstein G., Berger P.H., Brunt A.A., Lawson R.H. Springer-Science. Dordrecht. 2001. P. 451

142. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV: [электронный ресурс] - <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения 01.02.2019).
143. Atabekov J., Dobrov E., Karpova O., Rodionova N. Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution // *Molecular Plant Pathology*. 2007. Vol. 8, № 5. P. 667–675.
144. Gibbs A.J. Some observations on the structure of the filamentous particles of several plant viruses // *Journal of General Virology*. 1968. Vol. 2. P. 107–114.
145. Brandes J. et al. Size and shape of the particles of potato virus S, potato virus M, and carnation latent virus. // *Phytopathology*. 1959. Vol. 49, № 7. P. 443–446.
146. Kojima M., Shikata E., Sugawara M., Murayama D. Electron microscopy of potato leafroll virus // *Virology*. 1968. Vol. 39. P. 162–174.
147. Kegel W.K., van der Schoot P. Physical regulation of the self-assembly of tobacco mosaic virus coat protein // *Biophysical Journal*. 2006. Vol. 91, № 4. P. 1501–1512.
148. Игнатов А.Н. и др. Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России // *Защита и карантин растений*. 2008. № 4. С. 38–40.
149. Игнатов А.Н., Егорова М.С., Ходыкина М.В. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России // *Защита и карантин растений*. 2015. № 5. С. 6–10.
150. Golanowska M., Łojkowska E. A review on *Dickeya solani*, a new pathogenic bacterium causing loss in potato yield in Europe // *BioTechnologia*. 2016. Vol. 2, № 2. P. 109–127.
151. Huang J., Wu J., Li C., Xiao C., Wang G. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays // *Journal of Applied Microbiology*. 2009. Vol. 107, № 5. P. 1729–1739.
152. Yuliar, Nion Y.A., Toyota K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum* // *Microbes and Environments*. 2015. Vol. 30, № 1. P. 1–11.
153. De Boer S.H., Kelman A. Influence of oxygen concentration and storage factors on susceptibility of potato tubers to bacterial soft rot (*Erwinia carotovora*) // *Potato Research*. 1978. Vol. 21, № 1. P. 65–79.
154. Weintraub A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens // *Carbohydrate*

Research. 2003. Vol. 338, № 23. P. 2539–2547.

155. Brogioni B., Berti F. Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review // *MedChemComm*. 2014. Vol. 5, № 8. P. 1058-1066.

156. Making and using antibodies - A practical handbook.// Ed. Howard G.C., Kaser M.R. CRC Press. Boca Raton. 2014. P. 446.

157. Griep R.A. et al. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3 // *Phytopathology*. 1998. Vol. 88, № 8. P. 795–803.

158. Peckham G.D., Kaneshiro W.S., Luu V., Berestecky J.M., Alvarez A.M. Specificity of monoclonal antibodies to strains of *Dickeya* sp. that cause bacterial heart rot of pineapple // *Hybridoma*. 2010. Vol. 29, № 5. P. 383–389.

159. De Boer S.H. Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum* // *Phytopathology*. 1984. Vol. 74, № 12. P. 1431-1434.

160. Lukacova M., Barák I., Kazár J. Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria // *Clinical Microbiology and Infection*. 2008. Vol. 14, № 3. P. 200–206.

161. Tonoli M., Davies K.A., Norsworthy P.J., Cohen J., Walport M.J. The anti-lipid A antibody HA-IA binds to rough Gram-negative bacteria, fixes complement and facilitates binding to erythrocyte CR1 (CD35) // *Clinical & Experimental Immunology*. 2008. Vol. 92, № 2. P. 232–238.

162. Hayward A.C. Latent Infections by Bacteria // *Annual Review of Phytopathology*. 1974. Vol. 12, № 1. P. 87–97.

163. Pérombelon M.C.M. The extent and survival of contamination of potato stocks in Scotland by *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica* // *Annals of Applied Biology*. 1972. Vol. 71, № 2. P. 111–117.

164. Pérombelon M.C.M. Sites of contamination and numbers of *Erwinia carotovora* present in stored seed potato stocks in Scotland // *Annals of Applied Biology*. 1973. Vol. 74, № 1. P. 59–65.

165. Hélias V., Andrivon D., Jouan B. Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* under field conditions and their effects on the yield of individual potato plants // *Plant Pathology*. 2000. Vol. 49, № 1. P. 23–32.

166. Hitchborn J.H., Hills G.J. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts // *Virology*. 1965. Vol. 27, № 4. P. 528–540
167. Chu P.W.G., Waterhouse P.M., Martin P.R., Gerlach W.L. New approaches to the detection of microbial plant pathogens // *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1989. Vol. 7, № 1. P. 45–112.
168. Nezhad A.S. Future of portable devices for plant pathogen diagnosis // *Lab on a Chip*. 2014. Vol. 14, № 16. P. 2887.
169. Charlermroj R. et al. Multiplex detection of plant pathogens using a microsphere immunoassay technology // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 4. e62344.
170. Bergervoet J.H.W. et al. Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV // *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 149, № 1. P. 63–68.
171. Charlermroj R. et al. Antibody array in a multiwell plate format for the sensitive and multiplexed detection of important plant pathogens // *Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 86, № 14. P. 7049–7056.
172. Бызова Н.А. и др. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции вирусов растений // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45, № 2. С. 225-231.
173. Ma L. et al. Comparison between gold nanoparticles and FITC as the labelling in lateral flow immunoassays for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* // *Food and Agricultural Immunology*. 2018. Vol. 29, № 1. P. 1074–1085.
174. Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B.B. Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity // *Journal of Immunological Methods*. 2010. Vol. 357, № 1–2. P. 17–25.
175. Nečas D., Klapetek P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis // *Open Physics*. 2012. Vol. 10, № 1. P. 181–188.
176. Slack S.A. Comparison of three serodiagnostic assays for detection of *Corynebacterium sepeidonicum* // *Phytopathology*. 1979. Vol. 69, № 2. P. 186.
177. Siev M. et al. Correlation between serum and plasma antibody titers to *Mycobacterial* antigens // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011. Vol. 18, № 1. P. 173–175.

178. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
179. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Physical Science*. 1973. Vol. 241, № 105. P. 20–22.
180. Pastrik K.-H., Elphinstone J.G., Pukall R. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S–23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control // *European Journal of Plant Pathology*. 2002. Vol. 108, № 9. P. 831–842.
181. Brandes J., Paul H.L. Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Virose // *Archiv für Mikrobiologie*. 1957. Vol. 368, № 4. P. 358–368.
182. Wetter C. Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre Verwendung als Antigene bei der Immunisierung mittels Freundschem Adjuvans // *Archiv für Mikrobiologie*. 1960. Vol. 37, № 3. P. 278–292.
183. Takanami Y., Kubo S. Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll // *Journal of General Virology*. 1979. Vol. 44, № 1. P. 153–159
184. Lisicka W. et al. Oxygen availability influences expression of *Dickeya solani* genes associated with virulence in potato (*Solanum tuberosum* L.) and chicory (*Cichorium intybus* L.) // *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9, № 374.
185. Um H.Y. et al. Altered gene expression and intracellular changes of the viable but nonculturable state in *Ralstonia solanacearum* by copper treatment // *The Plant Pathology Journal*. 2013. Vol. 29, № 4. P. 374–385.
186. Culver J.N. Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance // *Annual Review of Phytopathol.* 2002. Vol. 40, № 1. P. 287–308.
187. Kuznetsov Y.G., McPherson A. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 75, № 2. P. 268–285.
188. Van Regenmortel M. The conformational specificity of viral epitopes // *FEMS Microbiology Letters*. 1992. Vol. 100, № 1–3. P. 483–487.
189. Przewodowski W., Przewodowska A. Development of a sensitive and specific polyclonal antibody for serological detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* //

PLoS One. 2017. Vol. 12, № 1. e0169785.

190. Rousseaus J., Biserte G., Bazin H. The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin // *Molecular Immunology*. 1980. Vol. 17, № 4. P. 469–482.

191. Saha K., Bender F., Gizeli E. Comparative study of IgG binding to proteins g and a: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device // *Analytical Chemistry*. 2003. Vol. 75, № 4. P. 835–842.

192. Patel D., Shepherd P.P., Naylor J.A., McCance D.J. Reactivities of polyclonal and monoclonal antibodies raised to the major capsid protein of human papillomavirus type 16 // *Journal of General Virology*. 1989. Vol. 70. P. 69–77

193. Guo L. et al. Cross-reactivity between avian influenza A (H7N9) virus and divergent H7 subtypic- and heterosubtypic influenza A viruses // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, № 1. №. 22045

194. Olszewska W., Steward M.W. The molecular basis of the antigenic cross-reactivity between measles and cowpea mosaic viruses // *Virology*. 2003. Vol. 310, № 1. P. 183–189.

195. Liu R., Vaishnav R.A., Roberts A.M., Friedland R.P. Humans have antibodies against a plant virus: evidence from tobacco mosaic virus // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 4. e60621.

196. Zhou Y. et al. Impact of intrinsic affinity on functional binding and biological activity of EGFR antibodies // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012. Vol. 11, № 7. P. 1467–1476.

197. Xie C., Chen F., Yang T. A high-affinity anti-salbutamol monoclonal antibody: Key to a robust lateral-flow immunochromatographic assay // *Analytical Biochemistry*. 2012. Vol. 426, № 2. P. 118–125.

198. Mosley G.L., Nguyen P., Wu B.M., Kamei D.T. Development of quantitative radioactive methodologies on paper to determine important lateral-flow immunoassay parameters // *Lab on a Chip*. 2016. Vol. 16, № 15. P. 2871–2881.

199. Trinh M.-H. et al. Tobacco mosaic virus as an AFM tip calibrator // *Journal of Molecular Recognition*. 2011. Vol. 24, № 3. P. 503–510.

200. Krylov S.N. Kinetic CE: Foundation for homogeneous kinetic affinity methods // *Electrophoresis*. 2007. Vol. 28, № 1–2. P. 69–88.

201. Khlebtsov N.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from

extinction spectra // *Analytical Chemistry*. 2008. Vol. 80, № 17. P. 6620–6625.

202. Capomaccio R. et al. Determination of the structure and morphology of gold nanoparticle–HSA protein complexes // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 42. P. 17653–17657.

203. Park J.-W., Shumaker-Parry J.S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles // *Journal of the American Chemical Society*. 2014. Vol. 136, № 5. P. 1907–1921.

204. Zhang S., Moustafa Y., Huo Q. Different interaction modes of biomolecules with citrate-capped gold nanoparticles // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014. Vol. 6, № 23. P. 21184–21192.

205. Byzova N.A., Safenkova I.V., Slutsкая E.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.. Less is more: a comparison of antibody–gold nanoparticle conjugates of different ratios // *Bioconjugate Chemistry* 2017. Vol. 28, № 11. P. 2737–2746.

206. Moore T.L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions // *Chemical Society Reviews*. 2015. Vol. 44, № 17. P. 6287–6305.

207. Jans H., Liu X., Austin L., Maes G., Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies // *Analytical Chemistry*. 2009. Vol. 81, № 22. P. 9425–9432.

208. James A.E., Driskell J.D. Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS) // *Analyst*. 2013. Vol. 138, № 4. P. 1212–1218.

209. Mudalige T.K., Qu H., Van Haute D., Ansar S.M., Linder S.W. Capillary electrophoresis and asymmetric flow field-flow fractionation for size-based separation of engineered metallic nanoparticles: a critical comparative review // *Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 106. P. 202–212.

210. Tadros T. Interparticle interactions in concentrated suspensions and their bulk (rheological) properties // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011. Vol. 168, № 1–2. P. 263–277.

211. Sotnikov D.V., Berlina A.N., Ivanov V.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. Vol. 173, P. 557–563.

212. Sacristán S., Malpica J.M., Fraile A., Garcia-Arenal F. Estimation of population

bottlenecks during systemic movement of tobacco mosaic virus in tobacco plants. // Journal of virology. 2003. Vol. 77, № 18. P. 9906–9911.

213. Moury B., Fabre F., Senoussi R. Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. Vol. 104, № 45. P. 17891–17896.

214. Pérombelon M.C.M., Lowe R. Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers // Potato Research. 1975. Vol. 18, № 1. P. 64–82.

215. De Boer S.H., Cuppels D.A., Gitaitis R.D. Detecting latent bacterial infections // Advances in Botanical Research 1996. Vol. 23, № C. P. 27–57.

216. Li J., Duan H., Xu P., Huang X., Xiong Y. Effect of different-sized spherical gold nanoparticles grown layer by layer on the sensitivity of an immunochromatographic assay // RSC Advances. 2016. Vol. 6, № 31. P. 26178–26185.

217. Zhang W. et al. Effect of different-sized gold nanoflowers on the detection performance of immunochromatographic assay for human chorionic gonadotropin detection // Talanta. 2019. Vol. 194. P. 604–610.

218. Bania I., Mahanta R. Evaluation of peroxidases from various plant sources // International Journal of Scientific and Research Publications. 2012. Vol. 2, № 5. P. 1–5.

219. Altman F.P. Tetrazolium salts and formazans // Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 1976. Vol. 9, № 3. P. 1-56.

220. Liu C.C., Yeung C.-Y., Chen P.-H., Yeh M.-K., Hou S.-Y. *Salmonella* detection using 16S ribosomal DNA/RNA probe-gold nanoparticles and lateral flow immunoassay // Food Chemistry. 2013. Vol. 141, № 3. P. 2526–2532.

221. Tsukise A., Fujimori O., Yamada K. An efficient histochemical method for deoxyribonucleic acids using a silver enhancement procedure // The Histochemical Journal. 1990. Vol. 22, № 8. P. 409–415.

222. Li X., Nie J., Hammill D.L., Smith D., Xu H., De Boer S.H. A comprehensive comparison of assays for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 // Journal of Applied Microbiology. 2014. Vol. 117, № 4. P. 1132–1143.

223. Pradhanang P.M., Elphinstone J.G., Fox R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques // Plant Pathology. 2000. Vol. 49, № 4. P. 414–422.

224. Dreo T. et al. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. Vol. 406, № 26. P. 6513–6528.
225. Massart S., Nagy C., Jijakli M.H. Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay // *European Journal of Plant Pathology*. 2014. Vol. 138, № 1. P. 29–37.
226. Thanh N.T.K., Maclean N., Mahiddine S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution // *Chemical Reviews*. 2014. Vol. 114, № 15. P. 7610–7630.
227. Goldstein A., Soroka Y., Frušić-Zlotkin M., Popov I., Kohen R. High resolution SEM imaging of gold nanoparticles in cells and tissues // *Journal of Microscopy*. 2014. Vol. 256, № 3. P. 237–247.
228. Yan Y.M., Tel-Vered R., Yehezkeli O., Cheglakov Z., Willner I. Biocatalytic growth of Au nanoparticles immobilized on glucose oxidase enhances the ferrocene-mediated bioelectrocatalytic oxidation of glucose // *Advanced Materials*. 2008. Vol. 20, № 12. P. 2365–2370.
229. Rades S. et al. High-resolution imaging with SEM/T-SEM, EDX and SAM as a combined methodical approach for morphological and elemental analyses of single engineered nanoparticles // *RSC Advances*. 2014. Vol. 4, № 91. P. 49577–49587.
230. De Jong W.H., Burger M.C., Verheijen M.A., Geertsma R.E. Detection of the presence of gold nanoparticles in organs by transmission electron microscopy // *Materials*. 2010. Vol. 3, № 9. P. 4681–4694.
231. Mammen M., Choi S.-K., Whitesides G.M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors // *Angewandte Chemie International Edition*. 1998. Vol. 37, № 20. P. 2754–2794.