

DOI: 10.7868/S3034574X26010108
УДК 543.424.2

Оригинальная статья

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ И РЕГИСТРАЦИЕЙ СПЕКТРОВ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

К.В. Серебренникова, Н.С. Комова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев*

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

*E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Аннотация. Использование в иммунохроматографическом анализе (ИХА) спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) обеспечивает интеграцию экспрессности, простоты и специфичности иммуноанализа с высокой чувствительностью и точностью регистрации ГКР. Разработана иммунохроматографическая тест-система для определения антимюллера гормона (АМГ) — маркера овариального резерва у женщин репродуктивного периода. ИХА реализован в сэндвич-формате, в котором молекулы АМГ, содержащиеся в тестируемой пробе, взаимодействуют с парой моноклональных антител, распознающих разные эпитопы антигена, и образуют комплексы антител, иммобилизованное на мембране иммунохроматографической тест-полоски — АМГ — меченое антитело. Для мечения антител были применены биметаллические золото-серебряные наночастицы структуры ядро-оболочка, модифицированные ГКР-активной молекулой-репортером. Определены размерные характеристики наночастиц, условия их конъюгирования с антителами и проведения ИХА, обеспечивающие достижение минимального предела обнаружения АМГ. Разработанный ИХА-ГКР характеризовался пределом обнаружения 0,15 нг/мл и рабочим диапазоном 4,7–29,5 нг/мл, удовлетворяя практическим требованиям диагностики. Аналитическая система успешно применена для тестирования сыворотки крови.¹

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ, гигантское комбинационное рассеяние, биметаллические золото-серебряные наночастицы, ГКР иммунопроба, антимюллеров гормон

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 24-73-10207).

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Серебренникова К.В., Комова Н.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографического анализа антимюллера гормона с использованием биметаллических наночастиц и регистрацией спектров гигантского комбинационного рассеяния. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 1. С. 121–131. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010108>

© К. В. Серебренникова, Н. С. Комова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев, 2026

¹ Сокращения: ИХА — иммунохроматографический анализ; ГКР — гигантское комбинационное рассеяние; АМГ — антимюллеров гормон; ИФА — иммуноферментный анализ; ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия; НЧЗ — наночастицы золота; РМ — репортерная молекула.

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ANTI-MULLERIAN HORMONE USING BIMETALLIC NANOPARTICLES AND REGISTRATION OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING

K.V. Serebrennikova, N.S. Komova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev*

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

**E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

Abstract. The use of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) in immunochromatographic analysis (ICA) provides integration of rapidity, simplicity and specificity of immunoassay with high sensitivity and accuracy of SERS registration. An immunochromatographic test system has been developed for determination of anti-Müllerian hormone (AMH), a marker of ovarian reserve in women of reproductive age. ICA is implemented in a sandwich format, in which AMH molecules contained in the tested sample interact with a pair of monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the antigen and form complexes (antibody immobilized on the membrane of the immunochromatographic test strip) — AMH — labeled antibody. Bimetallic gold-silver nanoparticles of the core-shell structure, modified with a SERS-active reporter molecule, were used for labeling antibodies. Size characteristics of nanoparticles, conditions of their conjugation with antibodies and ICA implementation, ensuring achievement of the minimum detection limit of AMH, were determined. The developed ICA-SERS was characterized by a detection limit of 0.15 ng/mL and a working range of 4.7–29.5 ng/mL, satisfying practical diagnostic requirements. The analytical system has been successfully applied to testing blood serum.

Keywords: immunochromatographic analysis, surface-enhanced Raman spectroscopy, bimetallic gold-silver nanoparticles, SERS immunoprobe, anti-Müllerian hormone

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation (grant number Grant No. 24–73–10207).

Ethics declarations. The authors declare no conflict of interest.

Conflict of interests. This article does not contain any studies involving humans or animals as subjects.

Authors contribution. All authors made a significant contribution to the development of the concept, conduct of the study, and preparation of the article.

For Citation: Serebrennikova K.V., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of immunochromatographic analysis of anti-mullerian hormone using bimetallic nanoparticles and registration of surface-enhanced raman scattering. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(1):121–131. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010108>

ВВЕДЕНИЕ

Антимюллеров гормон (АМГ) представляет собой димерный гликопротеин с молекулярной массой 140 кДа, относящийся к семейству бета-трансформирующих факторов роста [1]. У женщин АМГ вырабатывается в небольших количествах гранулезными клетками яичников в период от рождения до менопаузы, а затем его уровень становится неопределяемым [2]. Секреция АМГ не зависит от других гормонов, в частности гонадотропинов. Кроме того, гормон экспрессируется на постоянном уровне независимо от фазы менструального цикла. Перечисленные свойства АМГ обуславливают перспективность его применения в качестве биомаркера для достоверной оценки овариального резерва женщины [3, 4]. Помимо этого, мониторинг уровня АМГ позволяет контролировать эффективность вспомогательной репродуктивной терапии [5, 6].

Наиболее распространенными методами контроля содержания АМГ в крови являются иммуноферментный анализ и хемилюминесцентный иммуноанализ [7–9]. Однако, несмотря на высокую точность, достоверность и широкий диапазон измерений, необходимость в лабораторном оборудовании и квалифицированном персонале, трудоемкость и продолжительность тестирования ограничивают широкое применение этих методов. Кроме того, отмечается низкая стабильность АМГ при хранении и транспортировке биопроб, которая может влиять на измеренные значения АМГ в сыворотке [10–12]. В этой связи сохраняется актуальность разработки новых платформ иммуноанализа, объединяющих следующие свойства: отсутствие необходимости в сложных/дорогостоящих приборах; применение лиофилизированных стабильных реагентов; простая процедура тестирования с возможностью его автономного проведения минимально обученными операторами [13, 14].

Благодаря своей простоте, скорости и низкой стоимости иммунохроматографический анализ (ИХА) признан наиболее подходящим методом экспрессного выявления (на месте, у постели больного) различных биомаркеров [15, 16]. В основе принципа ИХА лежат высокоспецифичное взаимодействие антиген–антитело и аффинное разделение образующихся иммунных комплексов в процессе движения жидкости вдоль пористых мембран [17]. Наиболее часто используемой меткой в ИХА, обеспечивающей детектируемый сигнал, являются наночастицы золота благодаря их доступности, простоте получения конъюгатов с антителами, стабильности и уникальным оптическим свойствам. Применение традиционного ИХА ограничивают низкая интенсивность колориметрического сигнала, генерируемого в результате формирования иммунокомплекса и концентрирования наночастиц золота, а также качественное или полуколичественное обнаружение целевых аналитов [18, 19].

Внимание исследователей сосредоточено на снижении предела обнаружения целевых соединений в ИХА и реализации количественного анализа с использованием новых меток [20–22] и способов регистрации сигнала [23–26].

Цель работы — разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции антимюллерова гормона с использованием биметаллических наночастиц в качестве нанодисперсного маркера и регистрации сигнала гигантского комбинационно-го рассеяния молекулы-репортера.

МЕТОДИКА

Реагенты и материалы. В работе использовали следующие реагенты: золотохлористоводородная кислота (HAuCl_4), цитрат натрия, желатин, Твин-20, биотин 3-сульфо-N-гидроксисукцинимид, 4-аминотиофенол, аскорбиновая кислота, нитрат серебра (Sigma Aldrich, США); рекомбинантные стрептавидин (СТР) и стрептавидин, меченный пероксидазой хрена (СТР-ПХ) («Имтек», Россия); 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) (АО «НВО Иммунотех», Россия); диметилсульфоксид (ДМСО) (Merck, Германия); тиолированный полиэтиленгликоль (ПЭГ-SH, 5 кДа, Abbexa, США); ПЭГ, содержащий ортопиримидилдисульфидную (OPSS) группу и терминальную NHS-группу (OPSS-ПЭГ-NHS, 5 кДа, Creative PEGWorks, США); моноклональные антитела к антимюллерову гормону, клоны 46сс (МАТ1) и 69сс (МАТ2), распознающие различные эпитопы антигена, а также рекомбинантный антимюллеров гормон («ХайТест», Россия). Вспомогательные реагенты (соли, кислоты и щелочи) были аналитической или химической чистоты.

Имуноферментный анализ (ИФА) проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (Corning Costar, США). Для изготовления иммунохроматографических тест-полосок использовали два вида рабочей нитроцеллюлозной мембраны — CNPC-SS12 (размер пор — 15 мкм) и CNPH-N/90 (размер пор — 15 мкм), впитывающую мембрану AP-045 и пластиковую подложку L-P25 (Advanced Microdevices, Индия). Исходный раствор АМГ (50 мкг/мл) готовили в 50 мМ цитратном буфере, pH 6,5.

Биотинилирование МАТ1. Биотинилирование МАТ1 проводили путем ковалентного связывания по методике, описанной в работе [27]. Для этого сначала МАТ1 диализовали против 50 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 100 мМ NaCl (ФБС), путем трехкратного центрифугирования с использованием микроцентрифужных пробирок Amicon 3K при 12 000 g и 4 °C в течение 15 мин. Биотин-N-гидроксисукцинимидный эфир растворяли в ДМСО и добавляли к антителам (5 мг/мл) в 10-кратном мольном избытке и инку-

бировавали в течение 2 ч при комнатной температуре (КТ). После этого биотинилированные МАТ1 диализовали против ФБС, как описано выше.

Иммуноферментный анализ АМГ. В лунки микропланшета вносили по 100 мкл МАТ2 в концентрации 1 мкг/мл в 10 мМ ФБС и инкубировали в течение 14 ч при 4 °С, после чего трехкратно промывали ФБС, содержащим 0,05 % детергента Твин-20 (ФБСТ). Далее в лунки добавляли по 100 мкл стандартных растворов АМГ в ФБСТ, содержащих 1 % желатина, и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После трехкратного промывания микропланшета ФБСТ добавляли по 100 мкл биотинилированных МАТ1 в концентрации 1 мкг/мл в ФБСТ, содержащих 1 % желатина, и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После трехкратной промывки ФБСТ добавляли по 100 мкл СТР-ПХ в разведении 1 : 5000 (ФБСТ с 1 % желатина) и инкубировали еще 1 ч при КТ. Далее микропланшет промывали 3 раза ФБСТ и 1 раз дистиллированной водой и определяли активность связанной ПХ. С этой целью в лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора субстрата, содержащего 0,42 мМ ТМБ и 1,8 мМ Н₂O₂ в 0,1 М цитратном буфере, рН 4,0, и инкубировали при КТ в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 1,0 М Н₂SO₄ по 50 мкл в лунку и после этого измеряли оптическую плотность продукта реакции при 450 нм (ОП₄₅₀) с помощью микропланшетного фотометра Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Австрия).

Синтез и характеристика биметаллических наночастиц структуры ядро—оболочка. Наночастицы золота (НЧЗ) получали путем восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия по методике, описанной в работе [28]. К 100 мл кипящего 0,01%-ного раствора НАuCl₄ добавляли 2 мл 1%-ного цитрата натрия и выдерживали 15 мин при 100 °С. После этого раствор охлаждали и хранили при 4–6 °С.

Полученный препарат НЧЗ модифицировали Рамановской репортерной молекулой (РМ) — 4-аминотиофенолом. Для этого к 10 мл НЧЗ добавляли 10 мкл 0,2 мМ раствора РМ и инкубировали в течение 14 ч при КТ и постоянном перемешивании.

Для получения НЧЗ, покрытых серебряной оболочкой (НЧЗ-РМ-Аг), адаптировали методику, описанную в работе [29]. К 5 мл НЧЗ-РМ ([Au]₀ ≈ 0,25 мМ) добавляли 25 мкл 0,1 М аскорбиновой кислоты и выдерживали при 30 °С в течение 2 мин. Затем в смесь по каплям добавляли 125 мкл 10 мМ AgNO₃ и оставляли на 1 ч при перемешивании. После этого НЧЗ-РМ-Аг центрифугировали при 8000 g и перерастворяли в воде.

Характеристику НЧЗ и НЧЗ-РМ-Аг проводили методами абсорбционной спектроскопии, динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония). Гидродинамические диаметры

НЧЗ и НЧЗ-РМ-Аг определяли методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания). Для получения микрофотографий с помощью электронного микроскопа JEM-100C (Jeol, Япония) растворы НЧЗ и НЧЗ-РМ-Аг наносили на сеточки (300 меш.), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформаль, растворенного в хлороформе. Получаемые изображения анализировали с использованием программы Image Tool (Научный центр здоровья при Техасском Университете в Сан-Антонио, США).

Получение конъюгата НЧЗ-РМ-Аг с антителами. Ковалентную иммобилизацию МАТ1 на поверхности НЧЗ-РМ-Аг проводили следующим образом. К 500 мкл МАТ1 с концентрацией 100 мкг/мл в ФБС добавляли 10 мкл водного раствора OPSS-ПЭГ-NHS с концентрацией 2 мг/мл. Смесь инкубировали 40 мин при КТ, затем центрифугировали с использованием микроцентрифужных пробирок Amicon 30K при 10 000 g и 4 °С в течение 10 мин в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,6. Процедуру центрифугирования повторяли 3 раза. Далее 10 мкл раствора модифицированных МАТ1 с концентрацией 1 мг/мл вносили в 1 мл НЧЗ-РМ-Аг, полученных по методике, описанной в предыдущем разделе, и инкубировали 1 ч при КТ. В полученную смесь добавляли 20 мкл водного раствора ПЭГ-SH (1 мМ), оставляли еще на 20 мин и центрифугировали при 7000 g и 4 °С в течение 10 мин. Осадок перерастворяли в воде и повторяли процедуру центрифугирования еще 1 раз. Конечный осадок перерастворяли в ФБС, содержащем 1 % желатина, и хранили при 4 °С.

Иммобилизацию МАТ1 на поверхности НЧЗ-РМ-Аг путем физической сорбции проводили согласно следующей методике. 1 мл раствора НЧЗ-РМ-Аг (см. раздел «Синтез биметаллических наночастиц структуры ядро—оболочка») доводили до рН 8,5 с помощью 0,2 М K₂CO₃ с последующим добавлением МАТ1 до конечной концентрации 15 мкг/мл. Смесь инкубировали 1 ч при перемешивании и КТ, затем добавляли по 20 мкл раствора ПЭГ-SH (5 мг/мл) и инкубировали еще 30 мин. Полученный конъюгат осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин при 4 °С, перерастворяли в 10 мМ ФБС, содержащем 1% желатина, и хранили при 4 °С.

Изготовление иммунохроматографических тест-полосок. Для сборки тест-полосок использовали нитроцеллюлозную мембрану CNPC (CNPC-SS12) с размером пор 15 мкм и впитывающую мембрану AP-045, закрепленные на пластиковой подложке L-P25. Для формирования тестовой линии МАТ1 в концентрации 0,5 мг/мл в ФБС наносили с помощью диспенсера IsoFlow (Imagene Technology, США), режим нанесения — 1 мкл/см нитроцеллюлозной мембраны, и высушивали в течение 2 ч при 37 °С. После этого мультимембранный композит нарезали на тест-полоски шириной 4

мм с помощью гильотинного резака Index Cutter-1 (A-Point Technologies, США). Готовые тест-полоски хранили в пластиковом пакете с влагопоглотителем при КТ.

Иммунохроматографическое определение АМГ с регистрацией спектров ГКР. Для проведения ИХА-ГКР АМГ в лунки микропланшета вносили 40 мкл стандартных растворов/сыворотки крови (разбавленной в 5 раз ФБСТ с 1% желатина) с содержанием АМГ в концентрациях 0,15 – 1000 нг/мл. Далее в лунки вносили конъюгат НЧЗ-РМ-Ag-МАТ2 в объеме 0,25 – 2 мкл с оптической плотностью 4 при длине волны, соответствующей максимуму поглощения. Затем тест-полоски в вертикальном положении погружали в раствор и через 20 мин детектировали колориметрический сигнал.

После этого регистрировали ГКР спектры в 10 точках в середине тестовой линии с использованием рамановского спектрометра с микроскопом NS200 (Nanoscope Systems, Южная Корея). Все спектры были получены в одинаковых условиях: источник возбуждения с длиной волны 785 нм и мощностью лазера 20 %; время экспозиции составляло 20 с. Объектив 20× (NA=0,46) использовался для фокусировки лазерного пятна в тестовой области полоски.

Зависимости сигнала — интенсивности окрашивания или интенсивности характеристической полосы РМ (4-аминотиофенола) при 1077 см⁻¹ на спектре ГКР — в аналитической зоне (y) от концентрации антигена в пробе (x) аппроксимировали с помощью программы Origin версии 9.0 (OriginLab, США) с использованием 4-параметрической сигмоидной функции:

$$y = (a - b) / [1 + (x/c)^d] + b,$$

где a — максимальный сигнал, b — минимальный сигнал, c (или IC₅₀) — точка перегиба кривой в полулогарифмических координатах, d — наклон кривой в точке c.

Количественный предел обнаружения рассчитывали с использованием критерия трех стандартных отклонений для разницы между сигналами для образцов, содержащих и не содержащих АМГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика специфических реагентов. Моноклональные антитела против АМГ тестировали методом ИФА с целью выбора кандидатных антител, характеризовавшихся минимальным пределом обнаружения АМГ. Согласно полученной в ИФА концентрационной зависимости аналитического сигнала (ОП₄₅₀) для лучшей пары антител (рис. 1), предел обнаружения АМГ составил 26 нг/мл с рабочим диапазоном от 45 до 285 нг/мл, что свидетельствовало о возможности использования антител для разработки иммунохроматографического анализа с регистрацией спектров ГКР (ИХА-ГКР).

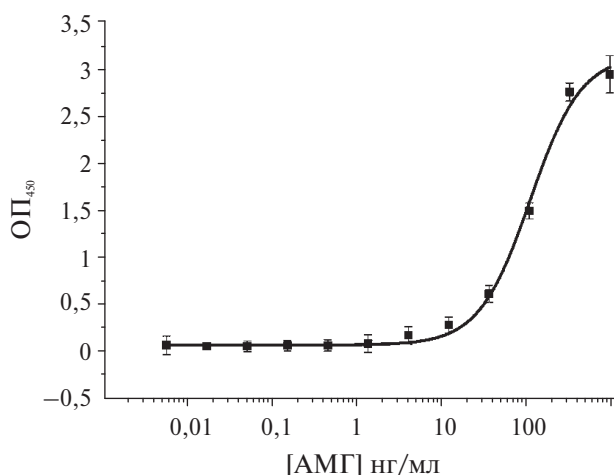


Рис. 1. Зависимость оптического поглощения при 450 нм от концентрации АМГ (отн. ед.) от концентрации АМГ (нг/мл), полученная в «сэндвич»-формате ИФА. Измерения выполнены в 3 повторах (n=3)

Fig. 1. The dependence of absorbance at 450 nm on the AMH concentration (ng/mL) obtained in the sandwich ELISA format. Measurements were performed in triplicate (n=3)

В качестве плазмонного нанодисперсного маркера (ГКР нанометки) использовали биметаллические золото-серебряные наночастицы (НЧЗ-РМ-Ag), модификация которых РМ, расположенной в зазоре между золотым ядром и серебряной оболочкой, обеспечивала усиление сигнала комбинационного рассеяния 4-аминотиофенола [30]. Как следует из рис. 2а, коллоид НЧЗ, полученный методом цитратного восстановления, демонстрировал пик плазмонного резонанса при 524 нм, а согласно данным ПЭМ соответствовал наночастицам сферической формы со средним диаметром 31,3 ± 4,9 нм (рис. 2б). После покрытия серебряной оболочкой в спектре поглощения НЧЗ-РМ-Ag наблюдали два пика при 378 нм и 501 нм, тогда как средний диаметр наночастиц, рассчитанный по результатам ПЭМ, составил 53,4 ± 9,2 нм. Измерения динамического рассеяния света для синтезированных препаратов (рис. 2в) показали средние значения гидродинамических диаметров 35,6 ± 6,7 нм для НЧЗ до покрытия оболочкой и 55,4 ± 10,4 нм после формирования НЧЗ-РМ-Ag.

Стоит отметить, что в препарате НЧЗ-РМ-Ag наблюдалось небольшое количество наночастиц размером менее 10 нм, образовавшихся предположительно в результате восстановления ионов серебра. В ГКР спектре 4-аминотиофенола, адсорбированного на поверхности НЧЗ, наблюдались характеристические пики при 1077 см⁻¹ и 1585 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям одиночных связей С-S и С-C [31], интенсивность которых после покрытия ядра НЧЗ серебряным слоем значительно возрастала (рис. 3).

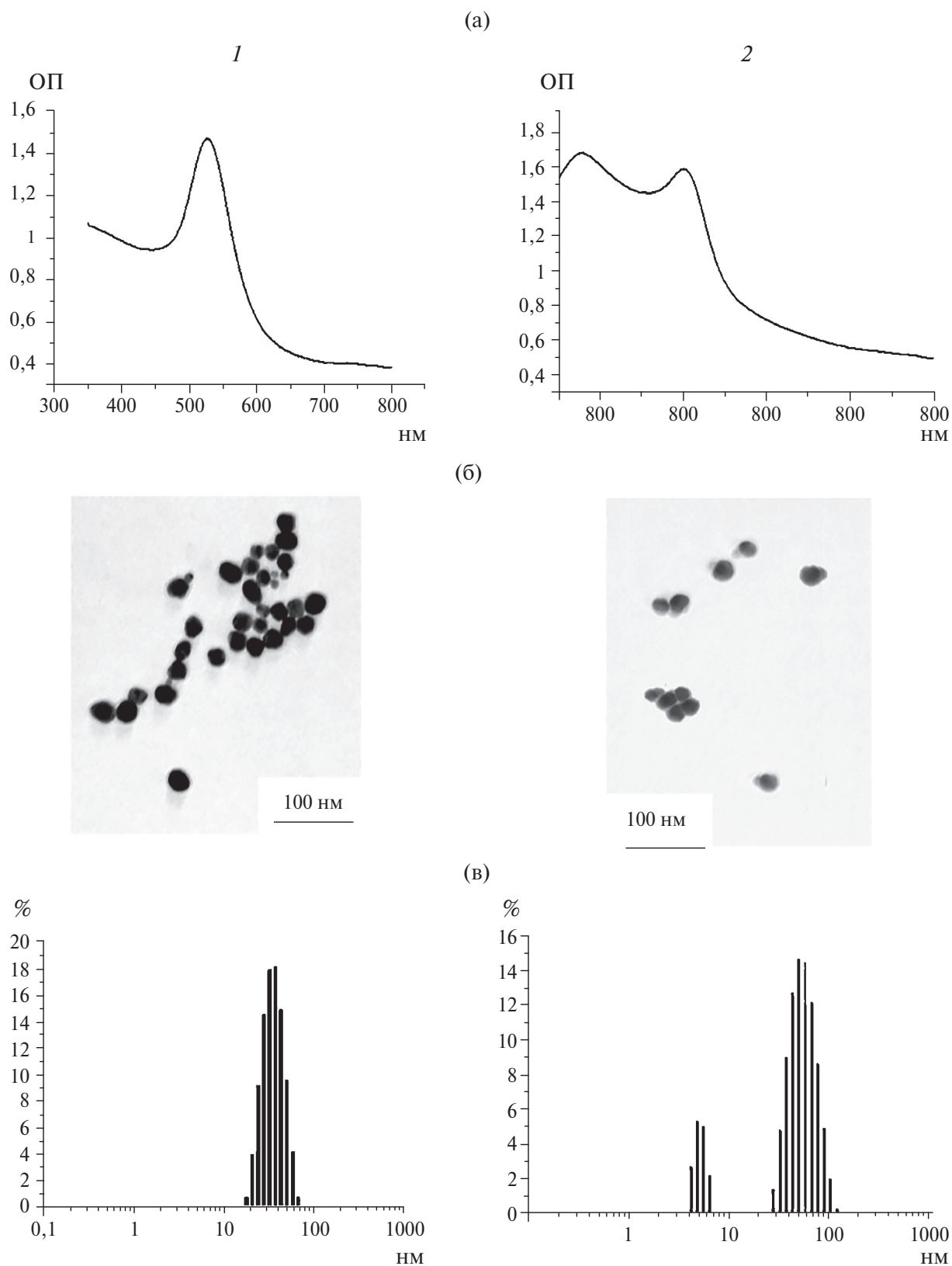


Рис. 2. Спектры поглощения (а), электронные микрофотографии (б) и гистограммы распределения наночастиц по размеру, полученные методом динамического рассеяния света (в), для препаратов НЧЗ (1) и НЧЗ-РМ-Аг (2)

Fig. 2. Absorption spectra (а), electron microphotographs (б) and histograms of the size distribution of nanoparticles obtained by dynamic light scattering (с) for the preparations GNP (1) and GNP-RM-Ag (2)

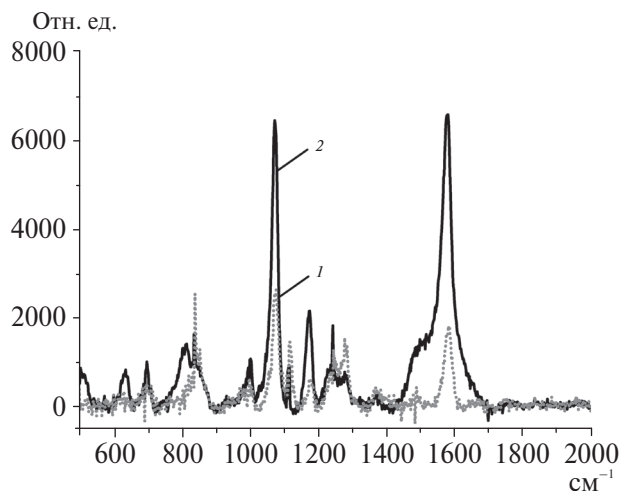


Рис. 3. Спектры гигантского комбинационного рассеяния света НЧЗ-РМ (1) и НЧЗ-РМ-Аг (2)
Fig. 3. SERS spectra of GNP-RM (1) and GNP-RM-Ag (2)

Полученные НЧЗ-РМ-Аг конъюгировали со специфическими моноклональными антителами (мАТ1) для формирования ГКР иммунопробы. Иммуноконъюгаты получали методами физической сорбции и ковалентной иммобилизации. Препарат, полученный физической сорбцией антител на поверхности НЧЗ-РМ-Аг, продемонстрировал высокий фоновый колориметрический сигнал и высокую интенсивность характеристических пиков репортера на спектре ГКР в отсутствие аналита (рис. 4а), что не отвечает требованиям, предъявляемым к иммуноанализу в сочетании с ГКР детекцией. Напротив, при ковалентной иммобилизации антител на поверхности НЧЗ-РМ-Аг фоновый сигнал в отсутствие целевого аналита не наблюдался (рис. 4б). Для получения ГКР иммунопроб и их применения в ИХА-ГКР была выбрана методика ковалентной иммобилизации.

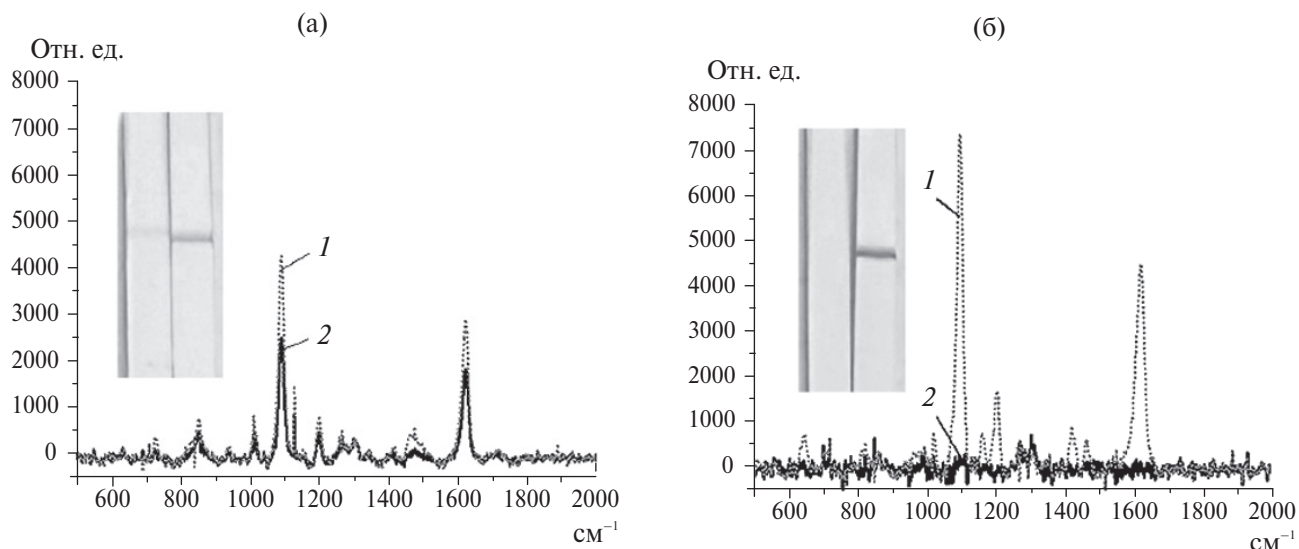


Рис. 4. ГКР спектры 4-аминотиофенола и цифровые изображения тест-полосок, полученные при проведении ИХА в присутствии 100 нг/мл (кривые 1) и в отсутствие (кривые 2) АМГ, с использованием иммуноконъюгатов НЧЗ-РМ-Аг с мАТ1, иммобилизованными посредством физической адсорбции (а) и ковалентного связывания (б)
Fig. 4. SERS spectra of 4-aminothiophenol and digital images of test strips obtained during ICA in the presence of 100 ng/ml (curves 1) and in the absence (curves 2) of AMH, using immunoconjugates of GNP-RM-Ag with mAb1 immobilized by physical adsorption (a) and covalent binding (b)

Разработка и апробация иммунохроматографического анализа АМГ с регистрацией спектров ГКР. В работе был реализован сэндвич-формат ИХА (рис. 5), в котором антиген взаимодействовал с ГКР иммунопробой, после чего образовавшийся комплекс под действием капиллярных сил мигрировал в тестовую зону с иммобилизованными мАТ2. В результате взаимодействия мАТ2 с комплексом антиген-ГКР иммунопроба формировался «сэндвич»-комплекс, который детектировали визуальным образом в виде оранжевого окрашивания в тестовой зоне или на Рамановском спектрометре в виде спектров

ГКР с характерными для 4-аминотиофенола пиками. В отсутствие АМГ в пробе окрашивания и детектируемого сигнала ГКР в тестовой зоне не наблюдалось.

С целью достижения низкого предела обнаружения АМГ, хорошей воспроизводимости и высокой интенсивности сигнала ГКР в тестовой зоне были оптимизированы концентрации иммунореагентов на рабочей мембране и в растворе, а также продолжительность анализа. Концентрацию иммобилизованных мАТ2 варьировали в диапазоне 0,25–1,5 мг/мл, ГКР иммунопробу

вносили в лунки микропланшета в диапазоне концентраций, соответствовавших $OP_{501} = 2-5$, в объемах от 0,25 до 2 мкл. Время инкубации образцов, содержащего АМГ, с ГКР иммунопробой в лунках микропланшета до погружения тест-полоски в раствор варьировали от 2 до 10 мин, а время инкубации тест-полоски в пробе — от 8 до 20 мин. Установлено, что минимальный предел

обнаружения АМГ достигался при концентрации МАТ2, равной 0,5 мг/мл, и объеме ГКР иммунопробы с $OP_{501}=4$, равном 0,5 мкл. Оптимальная продолжительность взаимодействия пробы, содержащей АМГ, с ГКР иммунопробой составила 5 мин, а продолжительность инкубации тест-полоски в растворе — 15 мин.

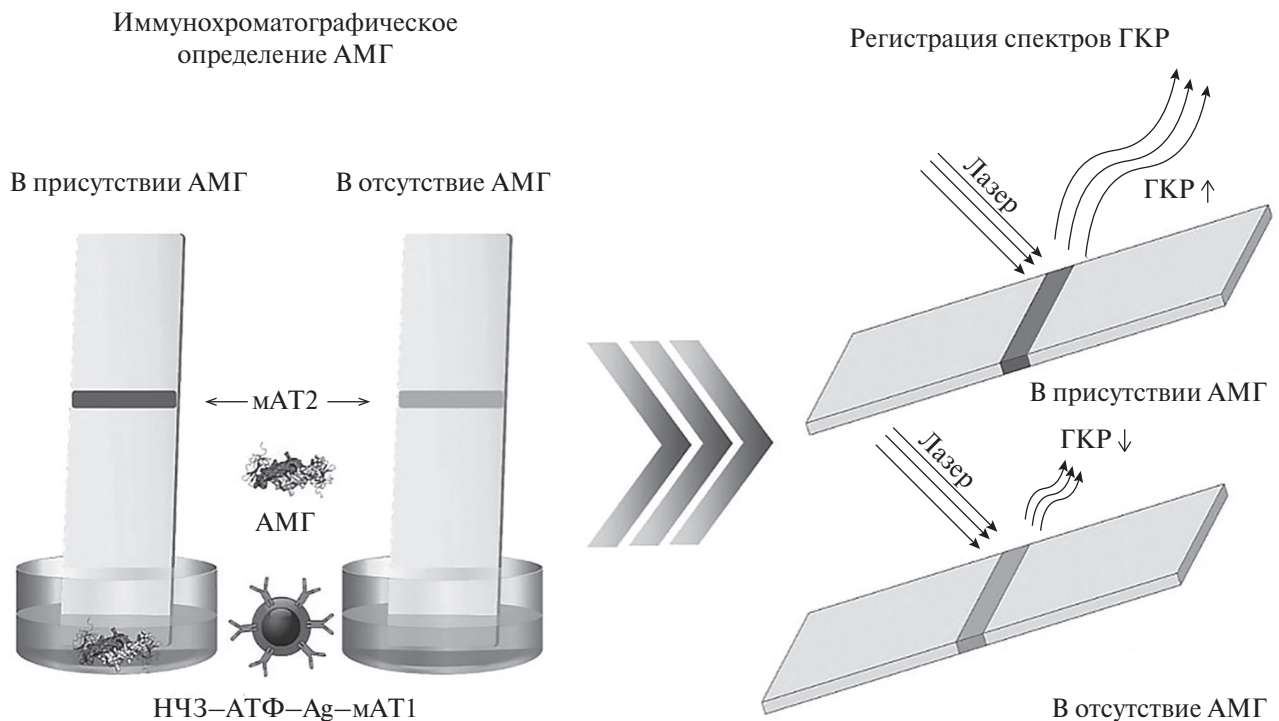


Рис. 5. Схема ИХА АМГ с использованием биметаллических наночастиц НЧЗ-РМ-Аг и регистрацией спектров ГКР
Fig. 5. Scheme of the ICA of AMH using bimetallic nanoparticles GNP-RM-Ag and registration of SERS spectra

На рис. 6а показаны изображения тест-полосок после пропускания стандартных растворов АМГ в диапазоне концентраций от 0 до 1000 нг/мл. Предел обнаружения и рабочий диапазон определения АМГ составили 0,76 нг/мл и 10,2 – 213,8 нг/мл соответственно. Зависимость интенсивности ГКР сигнала при 1077 см^{-1} от концентрации АМГ представлена на рис. 6б. Предел обнаружения составил 0,15 нг/мл, а рабочий диапазон определяемых концентраций — от 4,5 до 38,9 нг/мл. Таким образом, сравнение двух вариантов детекции сигнала показало, что регистрация спектров ГКР обеспечила выявление АМГ в концентрациях в 5 раз ниже.

Разработанная тест-система была апробирована в сыворотке крови человека. Тестирование ИХА-ГКР в пятикратно разбавленной сыворотке крови показало предел обнаружения АМГ 1,0 нг/мл после цифровой обработки колориметрического сигнала (рис. 7а) и 0,6 нг/мл после регистрации ГКР сигнала в тестовой зоне мембран (рис. 7б). Таким образом, проведенная апробация

ИХА-ГКР подтвердила возможность практического применения разработанной тест-системы на основе ГКР-иммунопробы для определения АМГ в сыворотке крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для определения АМГ, основанная на применении конъюгатов биметаллических золото-серебряных наночастиц структуры ядро-оболочка с антителами и регистрации связавшихся комплексов методом спектроскопии ГКР. Тест-система характеризовалась низким пределом обнаружения, равным 0,15 нг/мл. Проведенная апробация ИХА-ГКР показала возможность практического применения тест-системы для определения АМГ в сыворотке крови, а также ее перспективность для оценки овариального резерва и мониторинга эффективности репродуктивной терапии у женщин.

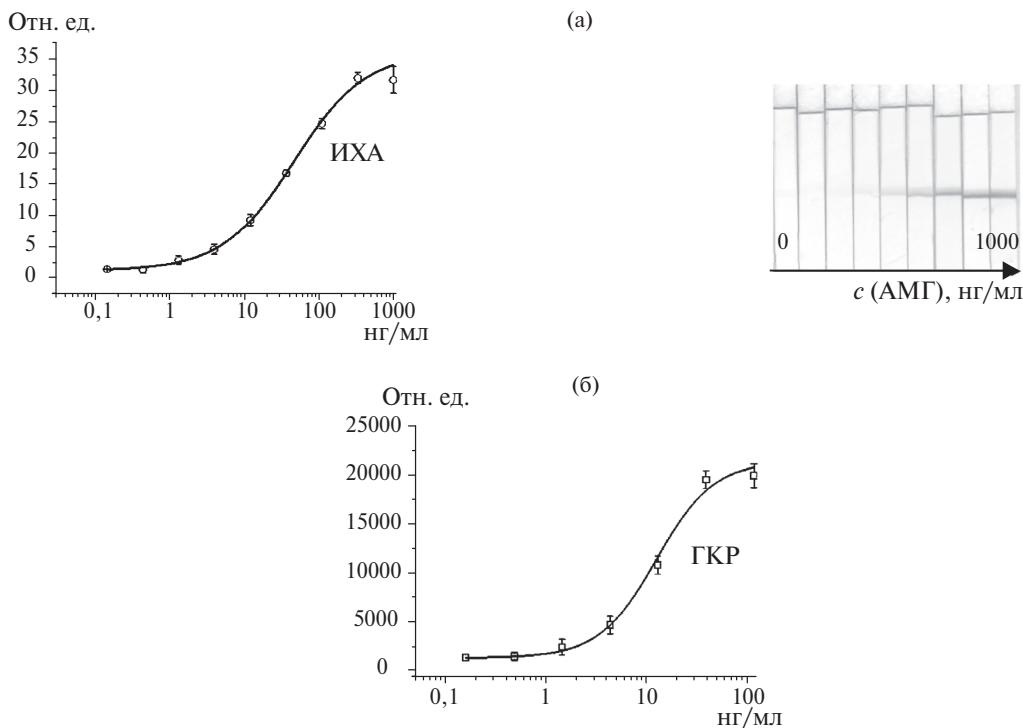


Рис. 6. Зависимость интенсивности окрашивания тестовой линии (отн. ед.) от концентрации АМГ в стандартных растворах (а) и соответствующие изображения тест-полосок (б), зависимость интенсивности сигнала ГКР при 1077 см^{-1} от концентрации АМГ в стандартном растворе, полученная с использованием НЧЗ-РМ-Аг (в)

Fig. 6. Dependence of color intensity (relative units) in the test line on the AMH concentration in standard solutions (a) and the corresponding images of test strips (b), dependence of the SERS signal intensity at 1077 cm^{-1} on the AMH concentration in the standard solution, obtained using GNP-RM-Ag (c)

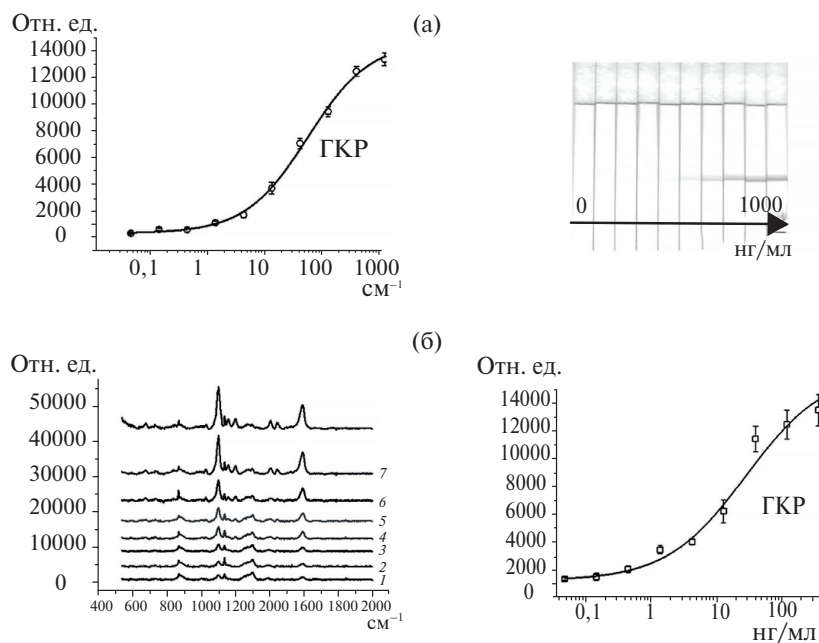


Рис. 7. Зависимость интенсивности окрашивания тестовой линии от концентрации АМГ, полученная в 5-кратно разбавленной сыворотке крови ($n = 3$) (а) и соответствующие изображения тест-полосок (б); ГКР спектры (в) и зависимость интенсивности сигнала ГКР при 1077 см^{-1} от концентрации АМГ в 5-кратно разбавленной сыворотке крови (г)

Fig. 7. Dependence of color intensity in the test line on the AMH concentration obtained in 5-fold diluted blood serum ($n = 3$) (a) and the corresponding images of the test strips (b); SERS spectra (c) and the dependence of the SERS signal intensity at 1077 cm^{-1} on the AMH concentration in 5-fold diluted blood serum (d)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Punchoo R., Bhoora S. *Front. Endocrinol.* 2021. V. 12. Article 719029. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.719029>
2. Kumar A., Kalra B., Patel A., McDavid L., Roudebush W.E. *J. Immunol. Methods.* 2010. V. 362. № 1–2. Pp. 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.08.011>
3. Tehrani F.R., Firouzi F., Behboudi-Gandevani S. *Aging Dis.* 2022. V. 13. № 2. Pp. 458–467. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0825>
4. Cedars M.I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2022. V. 107. № 6. Pp. 1510–1519. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac039>
5. Sellami I., Barbotin A.L., Bernard V., Robin G., Catteau-Jonard S., Sonigo C., Peigné M. *Semin. Reprod. Med.* 2024. V. 42. № 1. Pp. 025–033. <https://doi.org/10.1055/s-0044-1787273>
6. Iwase A., Asada Y., Sugishita Y., Osuka S., Kitajima M., Kawamura K. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2024. V. 50. № 1. Pp. 15–39. <https://doi.org/10.1111/jog.15818>
7. Yu Y., She T., Huang L., Xu J., Yan J., Jiang Q., Li H. *J. Immunol. Methods.* 2021. V. 494. Article 113059. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113059>
8. Zhao J.-J., Kang C.-M., Zhang P., Zheng, L. *J. Clin. Lab. Anal.* 2021. V. 35. Article e23734. <https://doi.org/10.1002/jcla.23734>
9. Nelson S.M., Pastuszek E., Kloss G., Malinowska I., Liss J., Lukaszuk A., Lukaszuk K. *Fertil. Steril.* 2015. V. 104. № 4. Pp. 1016–1021. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.024>
10. Fu Y.-X., Wang H., Hu T., Wang F.M., Hu R. *J. Int. Med. Res.* 2021. V. 49. № 5. Article 3000605211016161. <https://doi.org/10.1177/03000605211016161>
11. Li H.W.R., Robertson D.M., Burns C., Ledger W.L. *Front. Endocrinol.* 2021. V. 12. Article 691432. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.691432>
12. Khodavirdilou R., Pournaghi M., Rastgar Rezaei Y., Hajizadeh K., Khodavirdilou L., Javid F. et al. *J. Ovarian Res.* 2022. V. 15. № 1. Article 78. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01006-z>
13. Kinnamon D.S., Heggstad J.T., Liu J., Chilkoti A. *Ann. Rev. Anal. Chem.* 2022. V. 15. № 1. Pp. 123–149. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061020-123817>
14. Strohmaier-Nguyen D., Horn C., Baeumner A.J. *Biosens. Bioelectron.* 2025. V. 267. Article 116795. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116795>
15. Bai F., Bu T., Wang Z., Shao B. *Nano Today.* 2024. V. 57. Article 102403. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2024.102403>
16. Khelifa L., Hu Y., Jiang N., Yetisen A.K. *Lab Chip.* 2022. V. 22. № 22. Pp. 2451–2475. <https://doi.org/10.1039/D1LC00960E>
17. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. № 2. Pp. 143–151. <https://doi.org/10.1134/S0003683821020113>
18. He X., Hao T., Geng H., Li S., Ran C., Huo M., Shen Y. *Int. J. Nanomedicine.* 2023. V. 18. Pp. 7847–7863. <https://doi.org/10.2147/IJN.S436379>
19. Schuster da Silva S., Cunha M.L., Ayres L.B., Garcia C.D., Blanes L. *Anal. Methods.* 2023. V. 15. № 30. Pp. 3610–3630. <https://doi.org/10.1039/D3AY01081C>
20. Mirica A.-C., Stan D., Chelcea I.-C., Mihailescu C.M., Ofiteru A., Bocancia-Mateescu L.-A. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. Article 922772. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.922772>
21. Sanattalab E., Ayni E., Kaya K., Yildirim-Tirgilet N. *ChemistrySelect.* 2025. V. 10. № 7. Article e202405827. <https://doi.org/10.1002/slct.202405827>
22. Su Z., Dou W., Liu X., Ping J., Li D., Ying Y., Xie L. *Trends Anal. Chem.* 2022. V. 154. Article 116673. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116673>
23. Park J. *Sensors.* 2022. V. 22. № 19. Article 7398. <https://doi.org/10.3390/s22197398>
24. Sloan-Dennison S., O'Connor E., Dear J.W., Graham D., Fauldset K. *Anal. Bioanal. Chem.* 2022;(414):4541–4549. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03933-8>
25. Yadav S., Sadique M.A., Ranjan P. Kumar N., Singhal A., Srivastava A.K., Khan R. *ACS Appl. Bio Mater.* 2021. V. 4. № 4. Pp. 2974–2995. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00102>
26. Zherdev A.V., Zvereva E.A., Taranova N.A., Safenkova I.V., Vostrikova N.L., Dzantiev B.B. *Theory Pract. Meat Process.* 2024. V. 9. № 4. Pp. 280–295. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2024-9-4-280-295>
27. Fang Q., Wang L., Cheng Q., Wang Y., Wang S., Cai J., Liu F. *Food Anal. Methods.* 2015. V. 8. Pp. 1248–1257. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0012-7>

28. Shi L., Buhler E., Boué F., Carn F. *J. Colloid. Interface Sci.* 2017. V. 492. Pp. 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.065>
29. Bai T., Wang M., Cao M., Zhang J., Zhang K., Zhou P. et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. P. 410. Pp. 2291–2303. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0850-z>
30. Khlebtsov N.G., Lin L., Khlebtsov B.N., Ye J. *Theranostics.* 2020. V. 10. № 5. Pp. 2067–2094. <https://doi.org/10.7150/thno.39968>
31. López-Ramírez M.R., García-Gómez L., Forte-Castro A., Contreras-Cáceres R. *Spectrosc. J.* 2024. V. 2. № 3. Pp. 145–153. <https://doi.org/10.3390/spectroscj2030009>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Серебренникова Ксения Вячеславовна, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: ksenijasereb@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9507-4085>

Комова Надежда Сергеевна, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: nad4883@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3229-9073>

Жердев Анатолий Витальевич, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: zherdev@inbi.ras.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3008-2839>

Дзантиев Борис Борисович, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4008-4918>

ABOUT THE AUTHORS

Serebrennikova, Ksenia V. – A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: ksenijasereb@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9507-4085>

Komova, Nadezhda S. – A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: nad4883@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3229-9073>

Zherdev, Anatoly V. – A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: zherdev@inbi.ras.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3008-2839>

Dzantiev, Boris B. – A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4008-4918>

Поступила в редакцию 11.06.2025
После доработки 15.08.2025
Принята к публикации 29.09.2025

Received June 11, 2025
Revised August 15, 2025
Accepted September 29, 2025